



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Organizacja zespołów żeńskich komórek płciowych i przebieg procesu oogenezy niesporczaka *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018 (Eutardigrada, Parachela, Hypsibiidae)

Author: Marta Jezierska

Citation style: Jezierska, Marta. (2018). Organizacja zespołów żeńskich komórek płciowych i przebieg procesu oogenezy niesporczaka *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018 (Eutardigrada, Parachela, Hypsibiidae). Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt

MARTA JEZIEWSKA

**Organizacja zespołów żeńskich komórek płciowych i przebieg procesu oogenezy
niesporczaka *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018
(Eutardigrada, Parachela, Hypsibiidae)**

TOM I

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

DR HAB. IZABELI POPRAWY

Badania częściowo finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu
PRELUDIUM UMO-2014/15/N/NZ4/04350

Katowice, 2018

Słowa kluczowe: oogeneza, niesporczaki, żeńskie zespoły komórek płciowych, *Hypsibius exemplaris*, TEM, SEM, SBEM

Oświadczam, że ww. praca dyplomowa:

- nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tekst jednolity Dz. U. z 2006 r. Nr 90, poz. 631, z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem cywilnym,
- nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem/łam w sposób niedozwolony,
- nie była podstawą nadania dyplomu uczelni wyższej lub tytułu zawodowego ani mnie, ani innej osobie.

Oświadczam również, że treść pracy dyplomowej zamieszczonej przeze mnie w Archiwum Prac Dyplomowych jest identyczna z treścią zawartą w wydrukowanej wersji pracy. Jestem świadoma odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia.

Data

Podpis autora pracy

*Składam najserdeczniejsze podziękowania
dr hab. Izabeli Poprawie za zarażenie mnie ciekawością
do niesporczaków, ponad to za nieocenioną pomoc
oraz zaangażowanie udzielone mi w trakcie
powstawania niniejszej pracy.*

*Dziękuję również wszystkim pracownikom
oraz koleżankom i kolegom
z Katedry Histologii i Embriologii Zwierząt
za uwagi, pomoc oraz wsparcie.*

*Ponadto składam ogromne podziękowania
moim Rodzicom na których wsparcie i wiarę we mnie
mogłam liczyć przez wszystkie lata mojej edukacji.*

*Pragnę również podziękować mojemu Mężowi
za cierpliwość, zrozumienie, wsparcie i ogromną pomoc,
za wszystko.*

SPIS TREŚCI

TOM I

1. WSTĘP

- 1.1. Charakterystyka niesporczaków (Tardigrada)
- 1.2. Oogeneza i jej typy
- 1.3. Zespoły żeńskich komórek płciowych

2. CELE PRACY

3. MATERIAŁY

- 3.1. Charakterystyka badanego organizmu
- 3.2. Hodowla

4. METODY

- 4.1. Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)
 - 4.1.1. Pokrywanie siatek formvarem
 - 4.1.2. Czerwień rutenu – lokalizacja polisacharydów i mukopolisacharydów przy użyciu mikroskopu elektronowego
- 4.2. Histochemia
 - 4.2.1. Wykrywanie cukrów (metoda PAS)
 - 4.2.2. Wykrywanie białek (metoda Bonhag'a)
 - 4.2.3. Wykrywanie lipidów
- 4.3. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)
- 4.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa: metoda seryjnego skanowania powierzchni bloczka (SBEM)
- 4.5. Immunohistochemia
 - 4.5.1. Detekcja kropli lipidowych odczynnikiem BODIPY 483/503
 - 4.5.2. Metoda TUNEL - detekcja DNA komórek apoptotycznych
 - 4.5.3. Falloidyna sprzężona z rodaminą - lokalizacja szkieletu aktynowego
 - 4.5.4. Falloidyna Oregon Green - detekcja aktyny
 - 4.5.5. Przeciwciało przeciwko ufosforylowanej postaci histonu H3 – markera mitozy

5. WYNIKI

- 5.1. Cykl życiowy *H. exemplaris* w hodowli w temperaturze 16 °C
- 5.2. Budowa żeńskiej gonady

- 5.2.1. Ściana jajnika
- 5.2.2. Organizacja gonady
 - 5.2.2.1. Germarium
 - 5.2.2.2. Witelarium
- 5.3. Zmiany ultrastrukturalne zachodzące na terenie jajnika w trakcie procesu oogenezy
 - 5.3.1. Prewitelogeneza
 - 5.3.2. Witelogeneza
 - 5.3.2.1. Oocyt
 - 5.3.2.2. Trofocyty
 - 5.3.3. Późna witelogeneza/ Choriogeneza
 - 5.3.3.1. Oocyt
 - 5.3.3.2. Trofocyty
- 5.4. Analiza zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych w trakcie oogenezy
- 6. DYSKUSJA
- 7. WNIOSKI
- 8. STRESZCZENIE
- 9. SUMMARY
- 10. LITERATURA

TOM II

- 11. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

1. WSTĘP

1.1. Charakterystyka niesporczaków (Tardigrada)

Niesporczaki (Tardigrada) (zwane również wodnymi niedźwiadkami) są drobnymi bezkręgowcami (od 50 - 1200 μm długości). Po raz pierwszy zostały zaobserwowane przez pastora Johann'a Goeze'go w roku 1773, który opisał je jako „kleiner Wasserbär”, czyli małe wodne niedźwiadki. Spallanzani nazwał je „il tardigrado”, czyli „wolno kroczący”, skąd wzięła się ich nazwa „tardigrada” (Dewel i in. 1993). W roku 1838 francuski przyrodnik Felix Dujardin zaliczył niesporczaki do wrotków, a w 1889 Plate uznał, że są to prymitywne stawonogi (Kinchin 1994). Dopiero Ramazzotti w roku 1962 sklasyfikował niesporczaki jako odrębny typ w systematyce zwierząt bezkręgowych (Ramazzotti 1962). Pierwsze dowody na istnienie niesporczaków pochodzą z okresu środkowego Kambru (Paleozoik); okazy te uważane są za grupę macierzystą. Nieznacznie różniły się od „obecnych” Tardigrada liczbą odnóży (okazy środkowo-kambryjskie posiadały 3 pary odnóży podczas, gdy obecnie niesporczaki mają cztery pary) (Müller i in. 1995; Grimaldi i Engel 2005). Niesporczaki tworzą monofiletyczną grupę. Wraz z pazurnicami (Onychophora) oraz stawonogami (Arthropoda) należą do Panarthropoda, kladu Ecdysozoa (Aguinaldo i in. 1997; Nielsen 2001; Dunn i in. 2008; Mayer i Harzsch 2008; Telford 2008; Rota – Stabelli 2010; Nelson i in. 2015). Ich pozycja w systematyce zwierząt do dziś wydaje się niejasna i budzi wątpliwości. Z niektórych analiz molekularnych wynika, że Tardigrada są blisko spokrewnione z Nematoda (Roeding i in. 2007; Meusemann i in. 2010; Campbell i in. 2011; Rehm i in. 2011; Mayer i in. 2013; Borner i in. 2014). Analizy genetyczne 18S rRNA potwierdzają, że Tardigrada są siostrzaną grupą do Arthropoda i Onychophora (Garey i in. 1996; Nelson 2002; Garey i in. 2008; Nelson i in. 2010; Campbell i in. 2011; Mayer i in. 2013; Dunn i in. 2014), jednak ich pozycja w systematyce zwierząt bezkręgowych wymaga jeszcze dalszych badań. Niesporczaki posiadają bowiem wiele cech wspólnych zarówno z Cykloneuralia (otwór gębowy z trójdzielną gardzielą) (Schmidt-Rhaesa i in. 1998; Nelson 2002), jak i posiadają charakterystyczne cechy Panarthropoda (Schmidt-Rhaesa 2001). Naukowcy uważają, że w okresie Kambru (bądź nieco wcześniej) doszło do rozejścia się trzech głównych grup, które zaliczane są do Panarthropoda (Onychophora, Tardigrada, Arthropoda), co znajduje potwierdzenie w olbrzymiej różnorodności morfologicznej tych grup (Ou i in. 2012; Mayer i in. 2013). Z neuroanatomicznych badań porównawczych pazurnic, stawonogów i

niesporczaków wynika, że Tardigrada stanowią grupę siostrzaną raczej do Arthropoda niż do Onychophora, jednakże badania molekularne sugerują pokrewieństwo między Tardigrada i Onychophora lub Nematoda. Pozycja Tardigrada w systematyce zwierząt pozostaje więc wciąż niejasna i wymaga dalszych badań (Rota-Stabelli i in. 2010; Rehm i in. 2011; Mayer i in. 2013).

Niesporczaki to kosmopolityczne zwierzęta lądowe, słodkowodne i morskie (występują w gorących źródłach, na szczytach Himalajów, pod warstwami lodu i w osadach oceanicznych). Z danych literaturowych wynika, że można je spotkać nawet na wysokości 6600m n.p.m. (Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Ząbczyk 1999; Nelson 2002; Nelson i in. 2010, 2015; Glime 2017; Kaczmarek 2013). Wyróżnia się zarówno gatunki roślinożerne (żywiące się glonami) jak i drapieżne (polujące na nicienie, wrotki, pierwotniaki oraz inne niesporczaki) (Kinchin 1994; Garey i in. 2008; Glime 2017; Kaczmarek 2013). Znane są również gatunki ektopasożytnicze (np. *Echiniscoides hoepneri*) oraz komensale (Avdonina i in. 2007). Ponadto jeden gatunek (*Tetrakentron synaptae*) przystosował się do pasożytniczego trybu życia, a jego żywicielem jest strzykwa *Leptosynapta inhaerens* (Kinchin 1994). Tardigrada mają zdolność do zapadania w stan życia utajonego na dwa sposoby: kryptobioza i encystacja (Kinchin 1994; Guidetti i in. 2006, 2011; Nelson i in. 2010; Wełnicz i in. 2011; Nelson i in. 2015). Ze względu na czynnik wywołujący kryptobiozę wyróżnia się następujące jej typy: anhydrobiozę (wywoływaną przez brak odpowiedniej ilości wody), anoksybiozę (wywoływaną przez zbyt małe stężenie tlenu), kriobiozę (wywoływaną przez niską temperaturę) oraz osmobiozę (wywoływaną przez zmiany ciśnienia osmotycznego) (von Wenck 1914; Crowe 1975; Pennak 1978; Bertolani i in. 2004). W przypadku niewystarczającej ilości pokarmu lub zmian pH środowiska niesporczaki mają również zdolność do encystacji, dochodzi wówczas do przebudowy morfologicznej organizmu oraz do znacznego spadku procesów metabolicznych (Szymańska 1995). Zdolności do kryptobiozy pozwalają tym zwierzętom przetrwać w ekstremalnie niekorzystnych warunkach takich jak: ciśnienie (6000 atmosfer), próżnia, skrajnie wysokie (+151°C) i niskie (-272 °C) temperatury, promieniowanie (znoszą 1000 razy większą dawkę promieniowania jonizującego niż inne zwierzęta), skrajnie kwaśne pH (aż do 2,8), odwodnienie, działanie toksyn, a nawet warunki panujące w przestrzeni kosmicznej (Franceschi 1948; Jönsson i Bertolani 2001; Jönsson i Guidetti 2001; Grimaldi i Engel 2005; Poprawa i Galus 2007; Jönsson i in. 2008; Wełnicz i in. 2011). Z uwagi na ich niezwykle zdolności do przetrwania w skrajnie niekorzystnych warunkach środowiska w 2007 roku zrealizowano projekt TARDIS, w którym to wysłano

niesporczaki w przestrzeń kosmiczną. W ten sposób wykazano, że te bezkręgowce są w stanie przetrwać działanie próżni kosmicznej, galaktycznego promieniowania kosmicznego oraz promieniowania słonecznego (UV-A i UV-B oraz UVALL) (Jönsson i in. 2008).

W obrębie typu Tardigrada wyróżnia się trzy gromady: Heterotardigrada, Eutardigrada i Mesotardigrada, jednakże ostatnia gromada (Mesotardigrada) opiera się na opisie tylko jednego gatunku *Thermozodium esakii*. Niesporczak ten został opisany w 1937 roku przez Rahma. Jego występowanie jak dotąd nie zostało zweryfikowane. Materiał na podstawie którego opisano gatunek zaginął, a stanowisko z którego został opisany (gorące źródło w Japonii) uległo zniszczeniu na skutek trzęsienia ziemi (Greven 1984; Kinchin 1994; Nelson 2002; Kaczmarek 2013). Dlatego badania nad niesporczakami skupiają się nad pozostałymi dwiema gromadami. Gromada Heterotardigrada obejmuje dwa rzędy: Arthrotardigrada i Echiniscoidea, gromada Eutardigrada również obejmuje dwa rzędy: Parachela i Apochela (Degma i in. 2009 – 2018) (Schemat 1). Arthrotardigrada to głównie gatunki morskie z wykształconymi wyrostkami na części głowowej. Zwykle posiadają szczecinę głowową medialną (*cirrus medialis*) i zawsze obecna jest szczecina A (*cirrus A*). Do rzędu Echiniscoidea należą w większości gatunki lądowe, wyróżnia się zarówno niesporczaki opancerzone jak i nagie; szczecinki głowowe są słabiej wykształcone niż u Arthrotardigrada, *cirrus medialis* zwykle nie występuje w odróżnieniu od *cirrus A*, który jest zawsze obecny. Niesporczaki należące do rzędu Parachela to głównie gatunki lądowe oraz słodkowodne, a także kilka gatunków wtórnie morskich. Wśród Apochela występują tylko gatunki lądowe. Parachela nie posiadają szczecinek głowowych, a ich ciało nie jest opancerzone (Kinchin 1994; Nelson i in. 2010).

Niesporczaki charakteryzuje prosta budowa anatomiczna. Ciało w kształcie cylindrycznym jest spłaszczone po brzusznej stronie. U niesporczaków wyróżnia się pięć segmentów ciała: słabo wyodrębniony segment głowowy, trzy segmenty tułowia z trzema parami odnóży (na każdym segmencie jedna para) oraz segment kaudalny z czwartą parą odnóży. Trzy pary odnóży ułożone są w pozycji boczno – brzusznej, natomiast ostatnia czwarta para skierowana jest ku tyłowi. Ścianę ciała tworzy pojedyncza warstwa komórek nabłonkowych, które od strony zewnętrznej tworzą kutykulę (Ramazzotti i Maucci 1983; Greven 1984; Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Nelson 2002; Nelson i in. 2015). Układ nerwowy niesporczaków swoją budową przypomina plan budowy systemu nerwowego pierścienic oraz stawonogów – wykazuje metamerię. W głowowej części ciała obecny jest zwój głowowy (mózg) położony grzbietowo, który oplata przełyk i przechodzi w brzuszny

łańcuszek nerwowy typu drabinkowego. W obrębie brzusznego łańcuszka nerwowego występują dwa pnie nerwowe, które łączą 4 zwoje. Zwoje unerwiają cztery pary nieczłonowanych odnóży, które mogą być zakończone pazurami lub też przylgami (Doyère 1840; Thulin 1928; Marcus 1929; Greven 1980; Ramazzotti i Maucci 1983; Kinchin 1994; Wiederhöft i Greven 1996; Dewel i Dewel 1997; Dewel i in. 1993; Zantke i in. 2008; Persson i in. 2012; Mayer i in. 2013). Niesporczaki nie posiadają układu krążenia ani układu oddechowego - wymiana gazowa zachodzi na drodze dyfuzji przez całą powierzchnię ciała. Wymiana gazowa oraz dystrybucja składników odżywczych, a także odprowadzanie metabolitów odbywa się dzięki obecności płynu wypełniającego wolne przestrzenie jamy ciała (Hickman i in. 2014). Dodatkowo w płynie jamy ciała zawieszone są komórki – ciała spirzchowe. Komórki te pływają swobodnie w płynie jamy ciała, pełnią funkcje obronne, odżywcze, a także magazynują materiały zapasowe (Węglarska 1975, 1979, 1987; Szymańska 1994; Jönsson i Rebecchi 2002; Poprawa 2006; Reuner i in. 2010; Hyra i in. 2016b). Wydalanie zachodzić może na cztery sposoby: 1) dzięki aktywności ślinianek, które uczestniczą w linieniu aparatu bukalnego podczas zrzucania wylinki; 2) podczas linienia, gdy wydaliny są gromadzone w starej kutikuli i wraz z nią są usuwane w procesie linienia; 3) przy udziale komórek ściany jelita środkowego; 4) dzięki cewkom Malpighiego, które są typowym narządem wydalniczym obecnym w gromadzie Eutardigrada (Ramazzotti i Maucci 1983; Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Nelson i in. 2015). Przewód pokarmowy rozpoczyna się otworem gębowym i jest drożny. W układzie pokarmowym wyróżnia się trzy główne odcinki: jelito przednie, środkowe i tylne. U niektórych gatunków układ pokarmowy w swojej końcowej części może się łączyć z drogami wyprowadzającymi układu rozrodczego jak ma to miejsce u Eutardigrada. Takie wspólne ujście układu pokarmowego i rozrodczego nosi nazwę kloaki. U Heterotardigrada sytuacja wygląda inaczej, oba układy są rozdzielone i mają osobne ujścia: odbyt dla układu pokarmowego i gonopor dla układu rozrodczego. Gonada jest strukturą nieparzystą (jajnik u samic, jądra u samców, czy też ganada hermafrodytyczna). Samce posiadają parzyste przewody wyprowadzające, z kolei u samic i gatunków hermafrodytycznych obecne są nieparzyste przewody wyprowadzające. U niektórych gatunków niesporczaków np. *Macrobiotus hufelandi*, *Macrobiotus pallarii*, *Macrobiotus polonicus* mogą występować zbiorniczki nasienne (Bertolani 1983; Ramazzotti i Maucci 1983; Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Poprawa i Galus 2007; Nelson i in. 2015; Poprawa i in. 2015c). Gonada ma workowaty kształt i jest zlokalizowana w części grzbietowej ciała nad jelitem. W swojej przedniej części jest przytwierdzona do ściany ciała za pomocą wypustek

ściany jajnika zwanych filamentem terminalnym. U gatunków należących do gromady Eutardigrada filament terminalny zbudowany jest z dwóch ligamentów, natomiast u Heterotardigrada z pojedynczego ligamentu. W jajnikach gatunków gonochorycznych (rozdzielnopłciowych) oraz jajnikach gatunków partenogenetycznych wyróżnia się dwie strefy: mniejszą germarium i większą witelarium. Germarium zajmują niezróżnicowane komórki zwane oogoniami, z kolei w witelarium obecne są zespoły komórek płciowych powstałe na skutek niepełnych cytokinez. U gatunków hermafrodytycznych (obojnaczyh) w gonadzie występują strefa męska z męskimi komórkami rozrodczymi i strefa żeńska z żeńskimi komórkami rozrodczymi (np. u *Bertolanius weglarskae*, *Isohypsibius granulifer granulifer* czy *Macrobiotus joannae*) (Węglarska 1979; Ramazzotti i Maucci 1983; Poprawa 2005a; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015c, 2015d).

Do niedawna niesporczaki nie miały większego praktycznego bądź ekonomicznego znaczenia. Jednak zrozumienie ich właściwości kryptobiotycznych (Welnicz i in. 2011) pozwalających im na przetrwanie ekstremalnego odwodnienia, zamrażania, wystawienia na działanie próżni czy promieniowania jonizującego, dzięki stabilizacji kwasów nukleinowych oraz błon lipidowych, ma potencjalne zastosowanie w medycynie, farmakologii oraz w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (Schill i in. 2009). Wiedza na temat mechanizmów kryptobiotycznych doprowadziła już do wynalezienia tzw. suchych szczepionek (Roser 2006), które dzięki wydłużonemu czasowi działania oraz możliwości przechowywania w temperaturze pokojowej, znalazły zastosowanie w prewencji chorób w Trzecim Świecie. Niesporczaki są także bardzo obiecującym modelem w badaniach astrobiologicznych (Jönsson i in. 2008). Innymi słowy, lepsze poznanie biologii i budowy niesporczaków ma znaczenie nie tylko dla tardigradologów, zoologów czy biologów ewolucyjnych, ale także może zostać wykorzystane w innych, czasem bardzo odległych dziedzinach nauki.

W obrębie typu Tardigrada obserwuje się różne sposoby rozmnażania. Wśród niesporczaków występują gatunki rozdzielnopłciowe (*M. hufelandii*, *Hypsibius convergens*, *Pseudobiotus megalonyx*, *M. polonicus*), hermafrodytyczne (*Isohypsibius baicalensis*, *M. joannae*, *I. g. granulifer*, *B. weglarskae*), a także partenogenetyczne (*Milensium tardigradum*, *Dactylobiotus dispar*, *Dactylobiotus parthenogeneticus*, *Ramazzotius tribulosus*, *Hypsibius dujardini*, *Hypsibius exemplaris*) (Marcus 1929; Baumann 1961, 1964; Ammermann 1967; Bertolani 1971a, 1971b, 1975, 1976, 1979, 1982; Bertolani i in. 1983; Bertolani i Manicardi 1986; Węglarska 1987; Rebecchi i in. 2000; Poprawa 2005a, 2005b; Poprawa i in. 2015b,

2015c, 2015d). Co więcej w literaturze znaleźć można także doniesienia o gatunkach rozdzielnopłciowych, które wykazują także zdolność do partenogenezy jak np. *Paramacrobiotus richtersi* (Bertolani 1971a; Węglarska 1975) czy *M. hufelandi* (Bertolani 1975, 1982).

1.2. Oogeneza i jej typy

Oogeneza – proces prowadzący do powstania żeńskich gamet charakteryzuje się ogromną różnorodnością. Dlatego też wielokrotnie próbowano dla uproszczenia sklasyfikować ten proces. U najprostszych organizmów (np. gąbki, jamochłony, wirki oraz niektóre wstęznice) występuje oogeneza rozproszona (inaczej zwana dyfuzyjną), co oznacza, że gamety mogą być obecne w dowolnym miejscu organizmu i mogą powstać z różnych komórek (intestycjalnych, archeocytów) (Aizenshtadt 1988; Biliński 2005). U organizmów bardziej rozwiniętych w toku ewolucji doszło do wyodrębnienia narządów (gonad), w których zachodzi rozwój żeńskich komórek rozrodczych. Taki typ oogenezy nazywany jest oogenezą zlokalizowaną (inaczej gonadalną) (Biliński 2005; Ellis 2010). U organizmów, u których zachodzi oogeneza zlokalizowana wyróżnia się dwa typy oogenezy: solitarną i alimentarną. Jeśli rozwój oocyty nie jest wspomagany przez jakiejkolwiek komórki wówczas mówimy o oogenezie solitarnej (np. charakterystyczna dla niektórych stułbiopławów i krążkopławów). W oogenezie alimentarnej z kolei wokół dojrzewających oocytów obecny jest specjalny aparat troficzny – komórki dostarczające oocytowi niezbędne do wzrostu związki (Raven 1961). W zależności od typu komórek budujących aparat troficzny wyróżnić można oogenezę folikularną i nutrymentalną. W oogenezie folikularnej komórki wspomagające rozwój oocyty są komórkami folikularnymi (pęcherzykowymi) pochodzącymi z linii somatycznej, natomiast w oogenezie nutrymentalnej oprócz komórek folikularnych obecne są także komórki pochodzące z linii płciowej tzw. trofocyty (siostrzane komórki oocytów). Biorąc pod uwagę losy komórek płciowych proces oogenezy można podzielić na dwa typy: panoistyczny i meroistyczny (de Pomerai 1990; Biliński 1998). W oogenezie panoistycznej każda komórka żeńska linii płciowej ma potencjał by stać się oocytem, natomiast w oogenezie meroistycznej dochodzi zawsze do powstawania zespołów komórek płciowych, w ich obrębie część komórek (a czasem tylko jedna komórka zespołu) rozwija się w oocyt podczas, gdy pozostałe komórki pełnią funkcje komórek odżywczych (tzw. trofocytów) wspomagających

dojrzewający oocyt (Telfer 1975; Gutzeit 1986; Eckelbarger i Larson 1992; Urbisz i in. 2010; Tworzydło i in. 2014; Kot i in. 2016; Biliński i in. 2017).



Rycina 1. Schemat przedstawiający typy oogenezy.

1.3. Zespoły żeńskich komórek płciowych

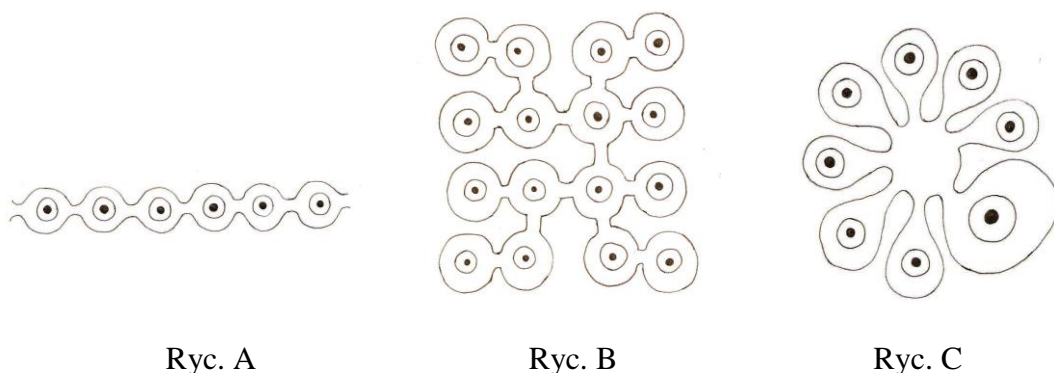
Tworzenie struktur zwanych zespołami komórek płciowych (zwanych również cystami, gronami, czy klonami) (Robinson i Cooley 1996; Świątek i in. 2009; Philips i in. 2010; Świątek i in. 2014) w trakcie procesu oogenezy jest zjawiskiem obserwowanym zarówno wśród kręgowców (Kloc i in. 2004; Pepling 2006; Mazzoni i in. 2010; Lechowska i in. 2011) jak i bezkręgowców (de Cuevas i in. 1997; Kubrakiewicz 1999; Alexandrova i in. 2005; Poprawa 2005a; Ganot i in. 2007a, 2007b; Ikuta i in. 2007; Świątek i in. 2009; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c; Urbisz i in. 2017). Poszczególne komórki budujące zespół komórkowy połączone są ze sobą mostkami cytoplazmatycznymi (mostkami międzykomórkowymi, kanałami cytoplazmatycznymi, pasmami cytoplazmatycznymi)

tworząc syncytium (Greenbaum i in. 2011; Haglund i in. 2011; Świątek i in. 2014). W zależności od położenia komórek względem siebie i rozmieszczenia mostków międzykomórkowych obserwuje się różne formy organizacji przestrzennej zespołów komórek płciowych. Wyróżnić można trzy podstawowe typy zespołów komórek płciowych:

- liniowe zespoły komórek płciowych (Ryc. 1A.) (występują u niektórych owadów, wieloszczetów, niektórych skorupiaków) połączone komórki tworzą łańcuchy komórek, gdzie każda komórka (poza terminalnymi komórkami zespołu) posiada dwa mostki międzykomórkowe (Biliński 1993, 1994; Świątek i in. 2009);

- zespoły komórek płciowych rozgałęzione np. w kształcie rozety (Ryc. 1B.) (występują u licznych stawonogów np. *Drosophila melanogaster*, a także płaza *Xenopus laevis*) – ich komórki posiadają różną liczbę mostków międzykomórkowych dzięki którym w zespołach tworzą się „rozgałęzienia” (Kubrakiewicz 1999; Pepling i in. 1999; Matova i Cooley 2001);

- zespoły komórkowe z centralną masą cytoplazmy (Ryc. 1C.) (pierścienice siodełkowe, nicienie, płazińce); cechą charakterystyczną tego zespołu komórek płciowych jest obecność centralnie zlokalizowanej, pozbawionej jądra komórkowego masy cytoplazmy (zwanej odpowiednio cytoforem u pierścienic i rachis u nicieni), z którą komórki zespołu łączą się za pomocą jednego mostka cytoplazmatycznego (Fernández i in. 1992; Spałek-Wołyńska i in. 2008; Świątek 2008; Świątek i in. 2009, 2012; Gorgoń i in. 2015; Małota i in. 2018).



Rycina 2. Podstawowe typy zespołów komórek płciowych. A – typ liniowy, B – typ rozgałęziony, C – typ z centralną masą cytoplazmy.

Podział ten jest bardzo ogólny, stąd znane są zespoły komórek płciowych, których budowa znacznie odbiega od budowy wymienionych wyżej typów zespołów. Przykładem

mogą być osłonice których zespoły komórek płciowych przyjmują formę syncytialnych coenocyst, czy też kolcogłowy z kulami jajnikowymi o charakterze syncytialnym (np. Crompton i Whitfield 1974; Ganot i in. 2007a, 2007b).

Tworzenie cyst/gron komórek płciowych w trakcie procesu gametogenezy jest powszechne, co sugeruje, że ich powstawanie ma kluczową rolę w prawidłowym rozwoju gamet. Zaburzenia związane z formowaniem i funkcjonowaniem gron komórek płciowych może prowadzić do niepłodności (Pepling i in. 1999; Greenbaum i in. 2006, 2011). Należy jednak podkreślić, że zjawisko to jest częstsze w przypadku spermatogenezy (Roosen - Runge 1962; Greenbaum i in. 2011) niż oogenezy.

Tworzenie cyst komórek płciowych w trakcie spermatogenezy warunkuje synchronizację podziałów komórkowych (Guo i Zeng 2004), a także homogenizację cytoplazmy komórek (równomierne rozmieszczenie białek, RNA, organelli i substancji odżywczych w cytoplazmie wszystkich komórek grona) (Baluška i in. 2006) dzięki czemu, wszystkie plemniki mimo różnic genotypowych są identyczne fenotypowo (Guo i Zeng 2004).

Natomiast w gametogenezie żeńskiej sytuacja wygląda bardzo różnie. W niektórych przypadkach w ogóle nie dochodzi do formowania gron komórek płciowych jak ma to miejsce u niektórych owadów (Büning 1994; Tworzydło i in. 2014), bądź powstają one tylko czasowo (Greenbaum i in. 2011). Zdarza się też, że zespoły komórek płciowych powstają wcześniej w wyniku niekompletnych podziałów mitotycznych i połączenia komórkowe utrzymują się niemal do końca trwania procesu oogenezy (Poprawa i in. 2015b). Dzięki obecności mostków cytoplazmatycznych łączących poszczególne komórki żeńskiego zespołu komórek płciowych dochodzi do polaryzacji cyst i zróżnicowania losów komórek płciowych, mianowicie jedna lub kilka komórek zespołu rozwija się w oocyt (oocyty), podczas gdy pozostałe komórki pełnią rolę trofocytów, czyli komórek odżywczych, których rolą jest wspomaganie rozwoju oocytu (oocytów) (Telfer 1975; Cooley i in. 1992; de Cuevas i in. 1997; Kubrakiewicz 1999; Kubrakiewicz i in. 1998; Poprawa i in. 2015b, 2015c, 2015d). Mostki międzykomórkowe tworzą swoiste „kanały”, którymi transportowane są z trofocytów do oocytu organella komórkowe, białka, substancje sygnałowe i substancje odżywcze (Deng i Lin 1997; de Cuevas i in. 1997; Baluska i in. 2006; Kloc i in. 2008; Anan'ina i in. 2010). Zespoły komórkowe nie są strukturami stałymi, gdy utrzymanie łączności pomiędzy komórkami zespołu nie jest już potrzebne dochodzi do zamknięcia mostków międzykomórkowych i rozpadu zespołu na poszczególne komórki (Świątek i in. 2014).

Pierwsze badania związane z budową jajnika niesporczaka oraz przebiegiem procesu oogenezy miały miejsce już w XIX wieku, jednak mimo to obecnie wciąż jest wiele luk w wiedzy dotyczących budowy i funkcjonowania tej struktury u niesporczaków. W ostatnich latach liczba publikacji dotyczących budowy jajnika oraz przebiegu oogenezy niesporczaków należących do gromady Parachela wzrosła, wciąż jednak brak hipotezy wyjaśniającej ewolucję jajnika niesporczaków. Takie dane byłyby bardzo pomocne w kontekście badań nad pozycją niesporczaków w obrębie kładu Ecdysozoa, szczególnie, że pozycja filogenetyczna niesporczaków w obrębie kładu wciąż jest kontrowersyjna. Dostarczenie danych morfologicznych związanych z budową jajnika, a także organizacji zespołów komórek płciowych, przebiegu oogenezy i owipozycji stanowić będzie dobre podstawy do analizy wzajemnych pokrewieństw w obrębie kładu Panarthropoda (co miało już miejsce u innych grup zwierząt jak np. Annelida (Bielecki i in. 2014).

Obecnie w literaturze znaleźć można kilka prac dotyczących gametogenezy u niesporczaków. Proces spermatogenezy został zaanlizowany dla gatunków *Batillipes noerrevangi* (Kristensen 1979), *I. granulifer* (Wolburg-Bucholz i Greven 1979), *Xerobiotus pseudohufelandi* (Rebecchi 1997). Dodatkowo znaleźć można także prace dotyczące samej struktury i ultrastruktury męskich komórek płciowych (Baccetti i in. 1971; Bertolani 1983; Baccetti 1987; Rebecchi i Guidi 1991; Guidi i Rebecchi 1996; Rebecchi i in. 2000). Prace dotyczące procesu oogenezy skupiają się w większości na strukturze kapsuły jajowej (Dastych 1973, 1975, 1980, 1988; Grigarick i in. 1973; Toftner i in. 1975; Węglarska 1975; Bertolani i Rebecchi 1993, 1996; Nelson i in. 1999).

Prace dotyczące zmian ultrastrukturalnych zachodzących w komórkach zespołów komórek płciowych w trakcie procesu oogenezy, dotyczą 7 gatunków niesporczaków, z czego wszystkie należą do gromady Eutardigrada; sześć z nich należy do tego samego rzędu Parachela (Węglarska 1979; 1982; 1987; Poprawa 2005a, 2005b; 2011; Poprawa i in. 2015b, 2015c, 2015d) i jeden do rzędu Apochela (Suzuki 2006). Tylko dwie prace opisują przestrzenną organizację zespołu komórek płciowych (Suzuki 2006, Poprawa i in. 2015b).

W związku z odmienną przestrzenną organizacją zespołów komórek płciowych u gatunków należących do jednej gromady (*M. tardigradum*, *D. parthenogeneticus*) (Suzuki 2006; Poprawa i in. 2015b), niezbędne wydają się dalsze badania skupiające się nie tylko na przebiegu samego procesu oogenezy i zmian ultrastrukturalnych zachodzących podczas oogenezy, ale także organizacji zespołu komórek płciowych, szczególnie u gatunku, który w 2007 roku został uznany nowym gatunkiem modelowym (Gabriel i in. 2007).

2. CELE PRACY

Głównym celem pracy doktorskiej był szczegółowy opis organizacji jajnika oraz zmian ultrastrukturalnych zachodzących na terenie jajnika w trakcie procesu oogenezy ze szczególnym uwzględnieniem organizacji zespołu komórek płciowych niesporczaka *Hypsibius exemplaris* (Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018) należącego do gromady Eutardigrada, rzędu Parachela, rodziny Hypsibiidae.

Cele szczegółowe to:

1. Opisanie budowy jajnika, tj. jego morfologii, ogólnej organizacji (wyróżnienie elementów składowych filamentu terminalnego, germarium i witelarium), typów komórek budujących gonadę (występowanie komórek płciowych i somatycznych).
2. Analiza formowania się i organizacji zespołów komórek płciowych oraz wykazanie czy w jajniku istnieje potencjał mitotyczny komórek płciowych w czasie życia zwierzęcia.
3. Analiza losów komórek płciowych w witelarium (badania nad oogenezą – przebieg procesów prewitelogenezy, witelogenezy i choriogenezy, wyjaśnienie losów komórek odżywczych, budowa kapsuły jajowej).
4. Analiza zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych w trakcie oogenezy.

3. MATERIAŁY

3.1. Charakterystyka badanego organizmu

Gatunek *Hypsibius exemplaris* został opisany na podstawie osobników zebranych z butwiejących liści stawu w Anglii (locus typicus: Wielka Brytania, Lancashire, Bolton, Darcy Lever; 53°33'32''N; 2°23'48''W; 75 m n.p.m.). Gatunek ten jest dostępny komercyjnie w firmie SCIENTO, która to pierwotnie gatunek *H. exemplaris* sprzedawała jako błędnie oznaczony gatunek *Hypsibius dujardini*. Osobniki pozyskane z firmy SCIENTO wykorzystywane były w wielu badaniach, których efektem są liczne publikacje (Gabriel i in.

2007; Gabriel i Goldstein 2007; Boothby i in. 2015; Beltrán-Pardo i in. 2013; Tenlen i in. 2013; Smith i Jockusch 2014; Gross i Mayer 2015; Arakawa i in. 2016; Bemm i in. 2016; Hyra i in. 2016a, 2016b; Fernandez i in. 2016; Hering i in. 2016; Kosztyła i in. 2016; Stec i in. 2016; Erdmann i in. 2017; Gross i in. 2017; Levin i in. 2016; Smith i in. 2017, Yoshida i in. 2017; Gross i in. 2018). Dopiero w 2018 roku została przeprowadzona weryfikacja taksonomiczna materiału rozprowadzanego przez firmę SCIENTO, a gatunek został oznaczony jako *H. exmeplaris* (Gąsiorek i in. 2018). W 2007 roku *H. exemplaris* (pod nazwą *H. dujardini*) został uznany za nowy organizm modelowy dla Ecdysozoa, obok *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*. Charakteryzują go łatwość utrzymywania w warunkach laboratoryjnych przez dziesiątki lat, a także możliwość kriokonserwacji osobników. Dodatkowo cechami przemawiającymi za *H. exemplaris* jako za gatunkiem modelowym są jego wielkość genomu (w wersji haploidalnej został oszacowany na ok. 75 MB), częstotliwość rozmnażania, oraz „optyczna przejrzystość”, która umożliwia obserwację struktur wewnętrznych i fizjologię w mikroskopie świetlnym (Gabriel. i in. 2007) (Film 1; Film 2). Ciało osobników ma barwę biaława, a na odcinku głowowym obecne są oczy. Powierzchnia kutikuli pokrywająca *H. exemplaris* jest gładka (Gabriel. i in. 2007; Gąsiorek i in. 2018). Gatunek ten ma ciało kształtu walcowatego spłaszczone po brzusznej stronie z czterema parami odnóży (Fot. 3A, B, C). Otwór gębowy otoczony jest cienkim pierścieniem okołobukalnym (Fot. 4A). Odnóża są zakończone pazurami charakterystycznymi dla typu *Hypsibus* (Fot. 4B).

3.2. Hodowla

Materiał do badań pozyskano komercyjnie z firmy SCIENTO (Mancheaster, UK). Hodowlę prowadzono w Katedrze Histologii i Embriologii Zwierząt (Uniwersytet Śląski w Katowicach) oraz Zakładzie Entomologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych (Uniwersytet Jagielloński, Kraków). Osobniki hodowano na 24 - dołkowych płytkach. Dno dołków pokryto cienką warstwą 1,5% agaru (160µl agaru na dołek) (w celu umożliwienia niesporczakom swobodnego ruchu), następnie wypełniano je medium hodowlanym (wodą destylowaną oraz wodą źródlaną Żywiec Zdrój w stosunku 1:1). Pokarm stanowiły glony *Chlorococcum* sp. i *Chlorella* sp. (pozyskane komercyjnie z firmy SCIENTO). Hodowlę prowadzono w stabilnych warunkach, w inkubatorze, w temperaturze 16°C. Optymalna dla

badanego gatunku temperatura hodowli została dobrana na podstawie danych eksperymentalnych uzyskanych przez zespół dr hab. Łukasza Michalczyka z Zakładu Entomologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ (informacja ustna). W każdym dołku umieszczano po jednym osobniku i następnie obserwowano zmiany zachodzące w jajniku. Aby mieć pewność co do czasu trwania procesu oogenezy, po umieszczeniu osobników w dołku odczekano do pierwszego złożenia jaj w hodowli i brano pod uwagę kolejny cykl, gdzie cały proces oogenezy odbył się w hodowli. Każdego osobnika kontrolowano dwa razy dziennie rano i wieczorem. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu stereoskopowego OLYMPUS SZ 40.

Dodatkowo prowadzono także hodowlę w plastikowych szalkach Petriego o zmatowionym papierem ściernym dnie, wypełnionych medium hodowlanym oraz pokarmem (jak wyżej), w takich samych warunkach jak hodowla na płytkach 24 - dołkowych.

4. METODY

4.1. Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

W celu lepszej penetracji płynów utrwalających osobniki nakłuwano igłą wolframową w okolicy głowy oraz odnóży, a następnie utrwalano w 2,5% glutaraldehydzie sporządzonym na 0,1M buforze fosforanowym (pH=7,4) w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po wypłukaniu w buforze fosforanowym, dodatkowo utrwalano przez 2 godziny w 2% roztworze czterotlenku osmu (OsO_4) w 0,1M buforze fosforanowym w temperaturze pokojowej. Utrwalone próbki przepłukiwano kilkakrotnie buforem fosforanowym, następnie odwadniano w szeregu alkoholu etylowego (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, każdy po 15 minut oraz dodatkowo 100% czterokrotnie po 15 minut), mieszaninie alkoholu absolutnego z acetonem (1:1) (15 minut) oraz acetonie (dwukrotnie po 15 minut). Następnie przepajano w mieszaninie acetonu z żywicą epoksydową (w stosunku objętościowym 1:1) w zamkniętych eppendorfach, po upływie 2 godzin eppendorfy otwierano i zostawiano w temperaturze pokojowej pod dygestorium do następnego dnia. Materiał zatapiano w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma). Żywica, w której zatopiony był materiał polimeryzowała w temperaturze 65°C przez 3 doby. Materiał krojono na skrawki półcienkie (około 800 nm) przy

użyciu noży szklanych oraz noża diamentowego na ultramikrotomie LKB ULTRATOME 4. Tak otrzymane skrawki barwiono 1% błękitem metylenowym w 1% boraksie (Dykstra 1992). Materiał analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym OLYMPUS BX60 przy użyciu kamery CX50, dokumentację gromadzono przy użyciu programu CellSense.

Skrawki ultracienkie (50 nm) uzyskiwano przy pomocy ultramikrotomu Leica UTC. Następnie skrawki przenoszono na siatki miedziane mesh 50 pokryte błoną formvarową (patrz niżej), kontrastowano octanem uranylu (7 minut) i cytrynianem ołowiu (7 minut) (Reynolds 1963). Analizę oraz zdjęcia wykonano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi H500 przy napięciu 75 kV. Dokumentację fotograficzną wykonano na błonach negatywowych czarno-białych Carestream Electron Microscope Film 4489, które następnie skanowano i obrabiano cyfrowo w Programie GIMP (program darmowy) oraz Photoshop CC (Adobe). Przy użyciu tej metody przeanalizowano 60 osobników.

4.1.1. Pokrywanie siatek formvarem

Szkiełka super frost moczo w wodzie z dodatkiem szarego mydła, a następnie wyprażano 20 min. w temperaturze 80°C. Tak przygotowane szkiełka pokrywano cienką warstwą 0,5% roztworu formvaru w chloroformie przy użyciu specjalnego oprzyrządowania (Fot. 1A, B). W górnej części znajduje się zbiorniczek do którego naciąga się roztwór formvaru i w którym umieszcza się wyprażone wcześniej szkiełko podstawowe (Fot. 1B). Następnie dzięki specjalnej gumowej gruszce równomiernie spuszcza się roztwór formvaru, który pokrywa szkiełko podstawowe z obu stron. Po wyschnięciu szkiełek, kolejno zanurzano je w wodzie destylowanej i ściągano z nich błonę formvarową na powierzchnię wody. Na błonie układano czyste, odtłuszczone siatki miedziane mesh 50 (Fot. 1C). Tak przygotowane siatki zbierano z powierzchni wody przy pomocy parafilmu i przechowywano w szczelnie zamkniętych szalkach Petriego.

4.1.2. Czerwień rutenu – lokalizacja polisacharydów i mukopolisacharydów przy użyciu mikroskopu elektronowego

W celu zlokalizowania polisacharydów oraz mukopolisacharydów w jajniku niesporczaka *H. exemplaris*, osobniki nakłuwano igłą wolframową, a następnie utrwalano w 2,5% glutaraldehydzie sporządzonym na 0,2M buforze kakodylowym w temperaturze 4 °C

przez 24 godziny. Materiał przepłukano w 0,2M buforze kakodylowym (trzykrotnie po 10 minut). Następnie materiał inkubowano w mieszaninie zawierającej 2% roztwór czterotlenku osmu w 0,2M buforze kakodylowym (pH 7,2) z 0.075% roztworem czerwieni rutenu w 0,2M buforze kakodylowym (pH 7,2) (w stosunku objętościowym 1:1). Materiał przeprowadzono przez szereg alkoholowy (alkohol etylowy, kolejno 30%, 50%, 70%, 80%, 90% i 96% – każdy po 15 minut oraz dodatkowo 100% czterokrotnie po 15 minut), w celu odwodnienia tkanek. Następnie materiał traktowano mieszaniną acetonu z alkoholem etylowym 100% (w stosunku objętościowym 1:1; 15 minut) oraz czystym acetonem (dwukrotnie po 15 minut). Tak utrwalone niesporczaki przepajano w mieszaninie żywicy epoksydowej i acetonu (w stosunku objętościowym 1:1), a następnie w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma). Żywica, w której zatopiony był materiał polimeryzowała w temperaturze 65°C minimum 3 doby. Materiał zatopiony w bloczki krojono na skrawki ultracienkie (50 nm) przy pomocy ultramikrotomu LKB ULTRATOME 4. Następnie skrawki przenoszono na siatki miedziane mesh 50 pokryte formvarem i kontrastowano jak do analizy z wykorzystaniem standardowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (patrz wyżej). Analizę oraz dokumentację fotograficzną wykonano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi H500 przy napięciu 75 kV. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 10 osobników.

Wynik barwienia: struktury zawierające polisacharydy oraz mukopolisacharydy mają dużą gęstość elektronową (ciemne).

4.2. Histochemia

Do badań histochemicznych wykorzystano materiał utrwalony jak do mikroskopii świetlnej i elektronowej (patrz wyżej). Zatopiony w żywicy materiał krojono na skrawki półcienkie (około 800 nm) przy użyciu noża diamentowego na ultramikrotomie LKB ULTRATOME 4, a następnie barwiono standardowymi metodami histochemicznymi (Litwin 1985).

4.2.1. Wykrywanie cukrów (metoda PAS)

Skrawki epoksydowe półcienkie przepłukano 70% alkoholem etylowym i inkubowano w 2% roztworze kwasu nadjodowego (w celu usunięcia osmu z tkanki) (10 minut, temperatura pokojowa). Następnie materiał ponownie przepłukano 70% alkoholem i poddano działaniu mieszaniny redukcyjnej (1g jodku potasu, 1g tiosiarczanu sodu, 30 ml 95% etanolu, 20 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml 2N HCl) (1 minuta, temperatura pokojowa). Po ponownym przepłukaniu w 70% alkoholu, skrawki barwiono odczynnikami Schiff'a (24 godziny, temperatura 37°C). Po zakończeniu barwienia skrawki przepłukano w wodzie bieżącej. Preparaty zamknięto w medium zamykającym DPX (Fluka). Materiał analizowano i fotografowano przy użyciu mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX60, z wykorzystaniem kamery cyfrowej OLYMPUS X650, oraz oprogramowania komputerowego cellSens Standard. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 20 osobników.

Wynik barwienia: obojętne polisacharydy wybarwiają się na kolor malinowo – czerwony.

4.2.2. Wykrywanie białek (metoda Bonhag'a)

Epoksydowe skrawki półcienkie inkubowano w 2% kwasie nadjodowym (10 min., temperatura pokojowa), płukano w bieżącej wodzie i barwiono błękitem rtęciowo-bromofenolowym (BPB) (24 godziny, temperatura 37°C). Następnie skrawki płukano w wodzie bieżącej do momentu pojawienia się niebieskiego zabarwienia. Uzyskane preparaty suszono i zamknięto w medium DPX (Fluka). Materiał analizowano i fotografowano przy użyciu mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX60, kamery cyfrowej OLYMPUS X650 i oprogramowania komputerowego cellSens Standard. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 20 osobników.

Wynik barwienia: białka obecne w tkance wybarwiają się na kolor niebieski.

4.2.3. Wykrywanie lipidów

Epoksydowe skrawki półcienkie barwiono 0,3% roztworem Sudanu Czarnego B (20 min, temperatura pokojowa.). Zabarwione skrawki przepłukano w 50% alkoholu, a następnie w wodzie destylowanej. Uzyskane preparaty suszono i tuż przed fotografowaniem zamknięto w medium DPX (Fluka). Dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX60, kamery cyfrowej OLYMPUS X650, oraz oprogramowania komputerowego cellSens Standard. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 20 osobników.

Wynik barwienia: lipidy wybarwiają się na kolor szary, ciemnobrunatny lub czarny.

4.3. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Osobniki przeznaczone do analizy w skaningowym mikroskopie elektronowym przeprowadzano przez szereg alkoholu etylowego (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 100%; każdy po 2 min.), a następnie przez szereg acetonowy sporządzony na alkoholu etylowym absolutnym (25%, 50%, 75%, 100%; każdy po 2 min.). Odwodniony materiał umieszczano w specjalnie przygotowanym pojemniku (Fot. 2A, B, C). Pojemnik został zrobiony z części eppendorfa oraz siatki limnologicznej. Materiał umieszczony we wspomnianym pojemniku suszono w punkcie krytycznym Pelco CPD2, następnie naklejano na stoliki mikroskopowe i napyłano złotem w napyłarce Pelco SC-6. Tak przygotowany materiał analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi UHR FE-SEM SU 8010 (Uniwersytet Śląski w Katowicach). Przy użyciu tej metody przeanalizowano 15 osobników.

4.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa: metoda seryjnego skanowania powierzchni bloczka (SBEM)

Osobniki przeznaczone do analizy utrwalano w mieszaninie 2,5% glutaraldehydu z 2% formaldehydem z dodatkiem 2mM chlorek wapnia (II) CaCl_2 . Roztwór utrwalający sporządzono na 0,15M buforze kakodylowym (pH 7,4). Materiał utrwalano w

temperaturze 35°C (5 min.), a następnie w 4°C (2h). Płukano zimnym buforem kakodylowym (0,15M) z dodatkiem 2mM chlorku wapnia (II) (5 razy po 3 minuty). Materiał prekontrastowano na lodzie w 3% żelazicyjanku potasu (w 0,5M buforze kakodylowym) zmieszanym z 4% wodnym roztworem czterotlenku osmu w stosunku objętościowym 1:1 (1h, 4°C). Następnie płukano wodą destylowaną (5 razy po 3 minuty w temperaturze pokojowej). Materiał inkubowano we wcześniej przefiltrowanym 1% roztworze tiokarbohydrazyny (20 min, temperatura pokojowa). Po przepłukaniu materiału wodą destylowaną (5 razy po 3 minuty) kontrastowano 2% wodnym roztworem czterotlenku osmu (30 minut), oraz inkubowano w 1% wodnym roztworze octanu uranylu (cała noc, 4°C). Następnego dnia po trzykrotnym przepłukaniu materiału wodą destylowaną niesporczaki inkubowano w roztworze Walton'a (pH 5,5) zawierającym: 0,066g azotanu ołowiu rozpuszczonego w 10ml 0,4% kwasu aspartanowego; inkubację prowadzono w cieplarni (30 minut, 60°C). Tak przygotowany materiał przepłukano wodą destylowaną (5 razy po 3 minuty). Pomiędzy kolejnymi kontrastowaniami i inkubacjami materiał płukano wodą destylowaną (5 x 3 minuty) następnie odwadniano w szeregu alkoholu etylowego (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100%, każdy po 15 minut), w mieszaninie alkoholu etylowego 100% i acetonu (1:1, 15 minut), płukano w acetonie (2 razy po 15 minut), przepajano i zatapiano w żywicy epoksydowej (w taki sam sposób jak do transmisyjnej mikroskopii elektronowej). Przygotowany materiał zatopiony w bloczki krojono na seryjne skrawki grubości 100 nm przy użyciu ultramikrotomu sprzężonego z mikroskopem skaningowym Gatan 3View (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, Warszawa). Przed skrojeniem kolejnego skrawka powierzchnię bloczka skanowano. W ten sposób uzyskane seryjne obrazy powierzchni bloczka po każdorazowym skrojeniu nożem diamentowym zbierano w rozdzielczości 2048/2048px (Fot. 5A). Uzyskane mikrofotografie powierzchni bloczka opracowano przy pomocy programu Fiji (ImageJ, program darmowy) w celu uzyskania animacji złożonej z obrazów kolejnych skrawków. Rekonstrukcje 3D wykonano w programie Imaris (Bitplane), w którym ręcznie obrysowywano poszczególne struktury. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 6 osobników.

4.5. Immunohistochemia

4.5.1. Detekcja kropli lipidowych odczynnikiem BODIPY 483/503

Osobniki utrwalano w 4% paraformaldehydzie (15 minut, temperatura pokojowa), a następnie płukano w buforze TBS (3 razy po 15 minut). Tak utrwalony materiał barwiono odczynnikiem BODIPY 483/503 (Molecular Probes) (20 µg/ml) (30 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Następnie materiał płukano w buforze TBS (3 razy po 10 minut). Na koniec materiał barwiono odczynnikiem Hoechst 33342 (Molecular Probes) w TBS (1:1000) (20 minut, temperatura pokojowa, w ciemności) i płukano w buforze TBS (3 razy po 10 minut). Osobniki przeniesiono na szkiełko podstawowe i zamknięto w medium Vectashield (Vector Laboratories). Analizę materiału i dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV 1000. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 50 osobników.

Wynik reakcji: krople lipidowe fluorescencja zielona, DNA jąder komórkowych fluorescencja niebieska.

4.5.2. Metoda TUNEL - detekcja DNA komórek apoptotycznych

Osobniki w całości utrwalano w 4% paraformaldehydzi (15 minut, temperatura pokojowa), następnie płukano w buforze TBS (3 razy po 15 minut, temperatura pokojowa), w 0,1% roztworze Triton X-100 w TBS (5 minut, temperatura pokojowa), w 0,1% roztworem Triton X-100 w 0,1% buforze cytrynianowym (2 minuty, temperatura 4°C) i na koniec materiał płukano w roztworze TBS (dwukrotnie po 5 minut, temperatura pokojowa). Tak przygotowane osobniki inkubowano w mieszaninie reakcyjnej TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche) (1 godzina, 37°C, w ciemności). Po zakończeniu inkubacji materiał płukano w roztworze TBS (dwa razy po 5 minut). Dodatkowo niesporczaki barwiono odczynnikiem Hoechst 33342 (1 µg/ml) w TBS (10 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Osobniki przeniesiono na szkiełko podstawowe, zamknięto w medium Vectashield (Vector Laboratories). Analizę materiału i dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV 1000. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 30 osobników.

Wynik reakcji: pocięte fragmenty DNA w jądrach apoptotycznych czerwona fluorescencja, DNA jąder komórkowych niebieska fluorescencja.

4.5.3. Falloidyna sprzężona z rodaminą - lokalizacja szkieletu aktynowego

Osobniki w całości płukano w buforze TBS (3 razy po 5 minut), następnie barwiono roztworem falloidyny znakowanej rodaminą (2 µg/ml) (40 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Przepłukano roztworem TBS oraz barwiono odczynnikiem Hoechst 33342 (1 µg/ml) w TBS (10 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Osobniki przeniesiono na szkiełko podstawowe i zamknięto w medium Vectashield (Vector Laboratories). Analizę materiału i dokumentację fotograficzną wykonano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV 1000. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 40 osobników.

Wynik reakcji: F-aktyna czerwona fluorescencja, DNA jąder komórkowych niebieska fluorescencja.

4.5.4. Falloidyna Oregon Green - detekcja aktyny

Osobniki w całości utrwalano w 4% paraformaldehydzie (15 minut), następnie płukano w 0,1% roztworze azydku sodu w buforze TBS (cała noc, 4°C). Następnego dnia osobniki płukano w buforze TBS z Tritonem X-100 (0,1% roztwór) (15 minut). Tak przygotowany materiał barwiono falloidyną sprzężoną z barwnikiem fluorescencyjnym Oregon Green (Molecular Probes) (1:40 w buforze TBS z azydkiem sodu) (24 godziny, temperatura pokojowa, w ciemności). Po inkubacji materiał przepłukano w TBS (2 razy po 10 minut). Następnie materiał barwiono odczynnikiem DAPI w TBS, (1:1000) (20 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Na koniec materiał płukano w buforze TBS (3 razy po 5 minut). Osobniki przeniesiono na szkiełko podstawowe i zamknięto w medium Vectashield (Vector Laboratories). Analizę materiału i dokumentację fotograficzną wykonano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV 1000. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 20 osobników.

Wynik reakcji: F-aktyna zielona fluorescencja, DNA jąder komórkowych niebieska fluorescencja.

4.5.5. Przeciwciało skierowane przeciwko ufosforylowanej postaci histonu H3 – marker mitozy

Osobniki w całości płukano w buforze TBS (3 razy po 5 minut), następnie 0,1% roztworem Tritonu X-100 w TBS (5 minut), po czym ponownie płukano w buforze TBS (5 minut). Materiał traktowano 1% roztworem BSA w TBS (30 minut, temperatura pokojowa). Następnie inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym (Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), Mitosis Marker, Millipore) rozcieńczonym w stosunku objętościowym 1:100 (10 µg/ml) w 1% roztworze BSA w TBS (całą noc, temperatura 4°C). Następnego dnia materiał płukano buforem TBS (3 razy po 5 minut) po czym inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z fluorochromem (goat anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488, Invitrogen), rozcieńczonym w 1% roztworze BSA w TBS w stosunku objętościowym 1:200 (1 godzina, temperatura pokojowa, w ciemności). Po zakończeniu inkubacji niesporczaki płukano buforem TBS (3 razy po 5 minut) i barwiono odczynnikiem Hoechst 33342 (1 µg/ml) w TBS (10 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Osobniki przeniesiono na szkiełko podstawowe i zamknięto w medium Vectashield (Vector Laboratories). Analizę materiału i dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV 1000. Przy użyciu tej metody przeanalizowano 30 osobników.

Wynik reakcji: ufosforylowana postać histonu H3 fluorescencja zielona, DNA jąder komórkowych fluorescencja niebieska.

5. WYNIKI

Materiał do badań stanowiły dorosłe osobniki *Hypsibius exemplaris* zakupione komercyjnie i hodowane w warunkach laboratoryjnych.

5.1 . Cykl życiowy *H. exemplaris* w hodowli w temperaturze 16°C

Osobniki *H. exemplaris* w hodowli to samice rozmnażające się partenogenetycznie. Pełen cykl oogenezy w hodowli, w temperaturze 16°C trwał 4 doby.

W pierwszym dniu oogenezy osobniki aktywnie poszukiwały pokarmu (glonów) w dołku hodowlanym. Ich ciało było transparentne, w jamie ciała widoczne były ciała spichrzowe poruszające się swobodnie w płynie jamy ciała z każdym ruchem niesporczaka. Światło jelita wyglądało na puste, a gonada była właściwie niemożliwa do zlokalizowania (analizując osobniki przy użyciu mikroskopu stereoskopowego) (Fot. 6A).

W drugim dniu oogenezy osobniki w dalszym ciągu pozostawały aktywne. Światło jelita wypełnione było pokarmem w postaci glonów, które prześwitywały przez powłoki ciała (zielony kolor). Ciała spichrzowe wyraźniej odcinały się od wnętrza jamy ciała. Nie obserwowano zauważalnych zmian w miejscu lokalizacji gonady (Fot. 6B).

W trzecim dniu oogenezy osobniki wciąż pozostawały aktywne. Światło jelita było wypełnione glonami, a ciała spichrzowe były łatwe do zaobserwowania. W obrębie jajnika obserwowano wyraźnie widoczne drobne kule – dojrzewające oocyty. Oocyty posiadały widoczne przejaśnienia będące prawdopodobnie jądrami komórkowymi (Fot. 6C).

W pierwszej połowie czwartego dnia osobniki charakteryzowała mniejsza ruchliwość. Światło jelita wypełnione glonami ulegało znacznemu zwężeniu z powodu jajnika, który zajmował znaczną część jamy ciała. W części grzbietowej obserwowano kule znacznej wielkości (oocyty) z wyraźnymi przejaśnieniami (prawdopodobnie jądra komórkowe). Ciała spichrzowe poruszały się trudniej w jamie ciała i nie były tak wyraźnie widoczne jak w drugim i trzecim dniu oogenezy. Oocyty sukcesywnie powiększały swą objętość i z czasem jajnik zajmował coraz większą część jamy ciała (Fot. 6D). Obserwowano charakterystyczne zachowanie osobników *H. exemplaris*, które rozpoczynały poszukiwanie odpowiedniego miejsca do złożenia jaj. Niesporczaki najczęściej wędrowały pomiędzy ścianką plastikowego dołka, a warstwę agaru. Zdarzało się także, że wciskały się w drobne

szpary powstałe w agarze w trakcie hodowli (uszkodzenia od igły preparacyjnej lub pipety). Z czasem samice całkowicie przestawały się poruszać. Ostatnim etapem przed rozpoczęciem owipozycji było linienie, które obejmowało nie tylko kutikulę powierzchni ciała, ale także jelito tylne i przednie wraz z aparatem bukalnym (u części osobników udało się zaobserwować brak aparatu bukalnego – stadium simplex). Stara kutikula oddzielała się od ciała niesporczaka, a osobnik pozostawał w jej wnętrzu – jakby w kokonie (Fot. 7A). Dopiero wtedy wewnątrz wylinki dochodziło do procesu owipozycji. Po złożeniu wszystkich jaj samica pozostawała w wylince około 1 - 2 godziny, po czym opuszczała wylinkę z jajami w poszukiwaniu pokarmu (Fot. 7B). Pierwsza wylinka *H. exemplaris* była związana tylko ze wzrostem osobnika i nie wiązała się z procesem owipozycji. W trakcie pierwszej owipozycji niesporczak składał zwykle 1 - 2 jaja. Wraz z kolejnymi wylinkami liczba składanych jaj rosła. Maksymalna zaobserwowana liczba jaj w wylince *H. exemplaris* w trakcie prowadzonej hodowli wynosiła 10. Następnie liczba ta zmniejszała się wraz z wiekiem zwierzęcia.

Zmieniająca się liczba jaj w wylince wynikała nie tylko z wieku niesporczaka, ale także z jego kondycji fizycznej; przy braku odpowiedniej ilości pokarmu lub niedostatecznym natlenieniu hodowli liczba jaj w wylinkach malała.

5.2. Budowa żeńskiej gonady

Żeński układ rozrodczy partenogenetycznego niesporczaka *H. exemplaris* to nieparzysta gonada przechodząca w nieparzysty przewód wyprowadzający otwierający się do kloaki. Gonadę żeńską u analizowanego gatunku stanowi pojedynczy, workowaty jajnik zlokalizowany po grzbietowej części ciała nad jelitem (Fot. 8A, B, 9A, 10A). Jego szczytowa część przytwierdzona jest do ściany ciała za pomocą struktury zwanej filamentem terminalnym (Fot. 10A). Filament terminalny u badanego gatunku tworzą wypustki komórek ściany jajnika. U badanego gatunku filament terminalny występuje w postaci dwóch nici przytwierdzonych do ściany ciała nad przednią częścią jelita środkowego (Fot. 9A, B). Dwie komórki w szczytowej części jajnika wytwarzają po jednej wypustce (Fot. 9A, B, 10A). Wypustki te mają postać pasm cytoplazmy otoczonych przez blaszkę podstawną (Fot. 9B). W tylnej części jajnika otwiera się do pojedynczego jajowodu. Gonopor jajowodu uchodzi do jelita w jego grzbietowej części (Fot. 10A, 11A). *H. exemplaris* posiada więc wspólne ujście układu pokarmowego i rozrodczego zwane kloaką. Otwór kloaki znajduje się po brzusznej stronie ciała, między trzecią i czwartą parą odnóży (Fot. 12A). Wraz z zaawansowaniem

procesu oogenezy wzrasta wielkość komórek wypełniających jajnik, w wyniku czego dochodzi do rozciągania ścian jajnika na skutek powiększającej się objętości gonady (Fot. 6A, B, C, D). Komórkom linii płciowej u analizowanego gatunku nie towarzyszą komórki pochodzenia somatycznego (nie stwierdzono obecności komórek folikularnych, które w formie nabłonka otaczałyby oocyty lub całe zespoły komórek linii płciowej). W jajniku obecne są tylko komórki linii płciowej wśród których wyróżnić można oocyty – przyszłe komórki jajowe, oraz wspomagające ich rozwój komórki odżywcze zwane trofocytami. W związku z taką organizacją gonady należy ją określić jako jajnik typu alimentarnego. Biorąc pod uwagę terminologię przyjętą dla bezkręgowców jajnik niesporczaka *H. exemplaris* jest jajnikiem meroistycznym.

5.2.1. Ściana jajnika

Ścianę jajnika tworzy pojedyncza warstwa spłaszczonych komórek somatycznych wspartych na blaszce podstawnej (nabłonek jednowarstwowy). Komórki te są częścią apikalną skierowane są do wnętrza gonady, podczas gdy ich część bazalna zlokalizowana jest po stronie zewnętrznej jajnika. Jądro komórkowe komórek ściany jajnika jest spłaszczone i zajmuje centralną część komórki. W cytoplazmie tych komórek obserwowano takie organella komórkowe jak: mitochondria, rybosomy, cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Fot. 13A, B). Ponadto w komórkach ściany jajnika *H. exemplaris* zaobserwowano występowanie dobrze rozwiniętego cytoszkieletu w postaci filamentów aktynowych (Fot. 13B, C). Komórki ściany jajnika tworzą wypustki, które penetrują pomiędzy żeńskie komórki płciowe, tworzą sieć, ale nie tworzą zwartej otoczki wokół komórek (Fot. 14A). W trakcie procesu oogenezy, gdy jajnik znacznie zwiększa swoją objętość, komórki ściany jajnika ulegają stopniowemu rozciąganiu i spłaszczaniu. Pod koniec procesu oogenezy, tuż przed rozpoczęciem owipozycji, gdy oocyty osiągną maksymalną wielkość, komórki ściany jajnika miejscami widoczne są jako cienkie pasma cytoplazmy (Fot. 14B).

5.2.2. Organizacja gonady

W obrębie partenogenetycznego jajnika *H. exemplaris* można wyróżnić dwie strefy: znacznie mniejszą germarium i dużo większą witelarium (Fot. 15A, 16A, B, 17A, B, C, Film 3).

5.2.2.1. Germarium

Germarium zajmuje szczytową część gonady żeńskiej (Fot. 15A, 16A, B, 17A, B, C, Film 3). Na jego terenie obserwowano niezróżnicowane komórki – oogonia. Komórki germarium mają kulisty kształt. W centralnej części każdej komórki zlokalizowane jest duże, owalne jądro komórkowe, którego otoczka tworzy niewielkie uwypuklenia skierowane do cytoplazmy (Fot. 18A). W części centralnej jądra komórkowego występuje duże jąderko o gąbczastej, heterogennej strukturze. Jąderko otoczone jest pojedynczymi skupiskami heterochromatyny. Cytoplazma oogoniów ma średnią gęstość elektronową, nie zawiera materiałów zapasowych. Na jej terenie obserwowano głównie mitochondria, liczne rybosomy oraz cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Fot. 18A).

5.2.2.2. Witelarium

Drugą większą część żeńskiej gonady zajmuje witelarium (Fot. 15A, 16A, B, 17A, B, C). Część tą wypełniają komórki połączone ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi tworzące struktury zwane zespołami komórek płciowych (cystami, gronami). Mostki są wynikiem podziałów komórkowych, w których nie doszło do zakończenia cytokinezy. Połączenia pomiędzy poszczególnymi komórkami grona (zespołu) komórek płciowych pozostają stabilne niemal do końca procesu oogenezy. Analiza jajnika niesporczaka *H. exemplaris* wskazuje na to, że oogeneza jest procesem ciągłym, a kolejne procesy oogenezy zaczynają się jeszcze zanim zakończy się poprzedni proces oogenezy. W witelarium jajnika obserwowano w tym samym czasie zarówno oocyty na etapie choriogenezy jak i młody żeński zespół komórek płciowych na początkowych etapach witelogenezy. Komórki młodego zespołu posiadały duże jądra komórkowe z ekscentrycznie zlokalizowanym jąderkiem. Niektóre jąderka posiadały wakuolę jąderkową. Na terenie cytoplazmy obserwowano nieliczne mitochondria, rybosomy oraz pierwsze kule materiałów zapasowych o dużej gęstości elektronowej (Fot. 19A, B). Zastosowane barwienia histochemiczne wykazały, że materiał gromadzony w cytoplazmie komórek młodego zespołu komórek płciowych to lipidy (Fot. 19C), polisacharydy (Fot. 19D) oraz białka (Fot. 19E). Witelarium zwiększa swoją objętość wraz z postępującym procesem oogenezy i wzrostem objętości oocytów.

5.3. Zmiany ultrastrukturalne zachodzące na terenie jajnika w trakcie procesu oogenezy

Na terenie germarium komórki (oogonia) przechodzą podziały mitotyczne (Fot. 20A, B) dzięki czemu możliwe jest utrzymanie stałej puli tych komórek. W wyniku niepełnych cytokinez komórki pozostają ze sobą połączone mostkami międzykomórkowymi tworząc grona/ zespoły. Komórki te rozpoczynają podział mejotyczny. Na terenie jąder komórkowych komórek w zespołach obserwowano równoległe ułożone, linijne, elektronowo gęste struktury – kompleksy synaptonemalne (Fot. 20C). Podział mejotyczny ostatecznie prowadzi do wytworzenia oocyta II rzędu – komórki, która jako jedyna ukończy podział mejotyczny i przekształci się w komórkę jajową. Mimo, że kilka komórek w zespole rozpoczyna podział mejotyczny, tylko jedna go ukończy. Uformowane młode zespoły komórek płciowych schodzą do witelarium, gdzie przechodzą szereg zmian ultrastrukturalnych w procesie oogenezy. Ze względu na charakterystyczne zmiany zachodzące w komórkach żeńskiego zespołu komórek płciowych w trakcie procesu oogenezy u badanego gatunku, wyróżniono następujące etapy tego procesu: prewitelogenezę, witelogenezę wczesną, środkową oraz późną i choriogenezę.

5.3.1. Prewitelogeneza

Komórki zespołu komórek płciowych na etapie prewitelogenezy połączone są ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi (Fot. 21A). Ściana mostka wzmocniona jest przez dwie okładziny: elektronowo gęstą okładzinę zewnętrzną i okładzinę wewnętrzną o średniej gęstości elektronowej (Fot. 22A, B). Komórki w zespole mogą posiadać różną liczbę mostków komórkowych od jednego do kilku co umożliwia tworzenie odgałęzień dzięki czemu powstaje zespół rozgałęziony (Fot. 21A). Komórki młodego zespołu komórek płciowych posiadają nieregularny kształt. Wszystkie komórki jednego zespołu mają taki sam kształt i wielkość oraz przechodzą podobne zmiany. W centrum komórki znajduje się duże jądro komórkowe zajmujące znaczną część cytoplazmy komórki. Jądro kształtem dopasowuje się do kształtu komórki. W jądrze komórkowym obserwowano pojedyncze jąderka zlokalizowane ekscentrycznie otoczone skupiskami heterochromatyny. Jąderka są dość duże, mają kulisty kształt i gąbczastą, heterogenną strukturę (Fot. 21A). Wnętrze jąderka ma

mniejszą gęstość elektronową niż jego zewnętrzna część. W niektórych komórkach zespołu komórek płciowych na terenie jądra obserwowano obecność kompleksów synaptonemalnych widocznych jako równolegle ułożone względem siebie elektronowo-gęste pasma. W jądrach komórkowych będących w trakcie podziałów mejotycznych nie obserwowano obecności jąderek. Na terenie cytoplazmy komórek stwierdzono występowanie rybosomów oraz takich organelli jak mitochondria i krótkie cysterny siateczki śródplazmatycznej. Na terenie cytoplazmy stabilnych mostków międzykomórkowych obserwowano na tym etapie tylko rybosomy i polirybosomy (Fot. 22A, B).

Etap prewitelogenezy u analizowanego gatunku *H. exemplaris* trwa bardzo krótko, jest dość trudny do uchwycenia w trakcie analiz z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Jego analizę znacznie ułatwiła znajomość czasu trwania procesu oogenezy u badanego gatunku w warunkach hodowli. Witelarium z komórkami w trakcie prewitelogenezy obserwowano u osobników tuż po opuszczeniu przez nie wylinki po owipozycji i rozpoczęciu aktywnego poszukiwania pokarmu.

5.3.2. Witelogeneza

Na etapie wczesnej witelogenezy wszystkie komórki zespołu komórkowego mają ten sam kształt i wielkość oraz przechodzą podobne zmiany. Komórki zespołu połączone są ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi (Fot. 23A). Ściany mostków międzykomórkowych wzmocnione są przez dwie okładziny, podobnie jak miało to miejsce na etapie prewitelogenezy. Okładzina zewnętrzna jest elektronowo gęsta, podczas gdy okładzina wewnętrzna ma mniejszą gęstość elektronową (Fot. 23B). Komórki zespołu mają nieregularny kształt. Na tak wczesnym etapie oogenezy niemożliwe jest określenie na podstawie cech morfologicznych, która z komórek zespołu będzie oocytem. W części centralnej każdej komórki obserwowano duże jądro komórkowe. Jądro komórkowe jest owalne, miejscami tworzy palczaste wypustki do cytoplazmy. Jądra komórkowe zawierają duże, kuliste jąderka o heterogennej, gąbczastej strukturze. Wnętrze jąderka ma mniejszą gęstość elektronową niż jego część zewnętrzna. Jąderko otoczone jest przez skupienia heterochromatyny. Na terenie cytoplazmy komórek obserwowano rybosomy, mitochondria posiadające wyraźne grzebień oraz elektronowo jasną macierz, cysterny szorstkiej siateczki

śródpłazmatycznej (Fot. 23A, B). Ponadto obserwowano występowanie niewielkich kul materiału zapasowego (żółtka) o dużej gęstości elektronowej (Fot. 23A, B). Na tym etapie oogenezy na terenie mostków cytoplazmatycznych obserwowano materiały zapasowe, rybosomy oraz mitochondria, co świadczy o ich transporcie z komórki do komórki (Fot. 23B). Wraz z zaawansowaniem procesu oogenezy komórki zespołu komórek płciowych powiększają swoją objętość. Połączenia międzykomórkowe pozostają stabilne. Mostki nadal posiadają dwie okładziny. Na terenie ich cytoplazmy obserwowano występowanie licznych organelli (Fot. 24A). Ilość cytoplazmy w komórkach wzrasta. Komórki gromadzą znaczną ilość grzebieniastych mitochondriów oraz kule materiałów zapasowych o dużej i średniej gęstości elektronowej (Fot. 24B).

Na etapie środkowej witelogenezy komórki zespołu wciąż pozostają połączone ze sobą stabilnymi mostkami cytoplazmatycznymi. Mostek w dalszym ciągu posiada dwie okładziny: elektronowo gęstą okładzinę zewnętrzną i okładzinę wewnętrzną o mniejszej gęstości elektronowej. Na terenie cytoplazmy mostków międzykomórkowych obserwuje się liczne organella komórkowe oraz kule materiałów zapasowych (Fot. 25A). Na etapie środkowej witelogenezy komórki w zespole zaczynają się różnicować. Jedna komórka zespołu zaczyna intensywnie rosnąć i gromadzić więcej cytoplazmy, rybosomów, organelli komórkowych oraz kul materiałów zapasowych. Ta komórka jest oocytem. Pozostałe komórki zespołu nie zwiększają swojej objętości i różnicują się w trofocyty (Fot. 26A).

Późna witelogeneza u *H. exemplaris* zbiega się w czasie z rozpoczęciem procesu tworzenia kapsuły jajowej, czyli z procesem choriogenezy.

5.3.2.1. Oocyt

Od etapu środkowej witelogenezy oocyt różni się morfologicznie od pozostałych komórek tworzących zespół. Jest znacznie większy i intensywnie zwiększa swoją objętość do końca trwania procesu witelogenezy. W centralnej części cytoplazmy oocyty zlokalizowane jest duże kuliste jądro komórkowe. Jądro posiada jedno duże jąderko o gąbczastej, heterogennej strukturze. Wnętrze jąderka ma mniejszą gęstość elektronową niż jego część zewnętrzna. W jąderku obserwuje się występowanie pojedynczej, dość dużej wakuoli jąderkowej. Wokół jąderka obecne są małe skupiska heterochromatyny (Fot. 27A). Cytoplazma oocyty jest bogata w rybosomy, organella komórkowe oraz kule żółtka.

Szczególnie liczne są grzebieniaste mitochondria o jasnej macierzy. Ponadto w cytoplazmie korowej oocyty pojawiają się nieliczne struktury nie obserwowane na wcześniejszych etapach oogenezy – małe pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie komórkowej (Fot. 26A). Oocyt intensywnie gromadzi żółtko. W cytoplazmie występują kule o różnych gęstościach elektronowych: mniejsze o dużej gęstości elektronowej, większe o średniej gęstości elektronowej oraz heterogenne o nieregularnym kształcie (Fot. 26A). Od etapu środkowej witelogenezy obserwowano także mitochondria ulegające transformacji – organella ulegają rozdzieleniu, stają się bardziej kuliste. Co więcej obserwowano zanik grzebieni oraz gromadzenie się w macierzy włóknistego materiału (Fot. 26A). Przeprowadzone reakcje histochemiczne wykazały, że materiały magazynowane w oocytach to lipidy (Fot. 28A), polisacharydy (Fot. 28B) oraz białka (Fot. 28C).

5.3.2.2. Trofocyty

Trofocyty na etapie środkowej witelogenezy różnią się od oocytów wielkością oraz ilością materiałów zapasowych gromadzonych w cytoplazmie. Komórki odżywcze mają mniejsze rozmiary, zawierają mniej cytoplazmy oraz magazynują mniej organelli komórkowych i mniej materiałów zapasowych (Fot. 26A). Jądra komórkowe trofocytów zajmują centralną część komórki. Kuliste jądro posiada jedno duże, kuliste jąderko. Wokół jąderka obecne są liczne elektronowo gęste skupiska heterochromatyny, liczniejsze niż te obserwowane w jądrach komórkowych oocytów. W jąderkach trofocytów obserwowano wakuole jąderkowe (Fot. 27B). Na terenie cytoplazmy obecne są grzebieniaste mitochondria oraz rybosomy. Cytoplazma trofocytów jest zdecydowanie uboższa w mitochondria w stosunku do cytoplazmy oocytów. Materiał zapasowy jest zróżnicowany, występują małe kule o dużej gęstości elektronowej oraz większe o średniej gęstości elektronowej. Ponadto w cytoplazmie pojawiają się pojedyncze, małe pęcherzykowate struktury o elektronowo gęstej błonie (Fot. 26A). Przeprowadzone reakcje histochemiczne wykazały, że materiały magazynowane na terenie cytoplazmy trofocytów to lipidy (Fot. 28A), polisacharydy (Fot. 28B) oraz białka (Fot. 28C). Ze względu na wzrastającą objętość cytoplazmy oocytów, trofocyty skupiają się pomiędzy oocytami tworząc charakterystyczne zgrupowania (Fot. 29A).

5.3.2. Późna witelogeneza/ Choriogeneza

Na etapie późnej witelogenezy u niesporczaka *H. exemplaris* rozpoczyna się proces choriogenezy, czyli proces tworzenia kapsuły jajowej.

5.3.3.1. Oocyt

Na etapie późnej witelogenezy oocyty obecne w jajniku są łatwe do zidentyfikowania przy użyciu mikroskopu stereoskopowego czy mikroskopu świetlnego. Na terenie grzbietowej części ciała, nad jelitem widoczne są kuliste struktury o jaśniejszym środku. Są to wzrastające oocyty z widocznymi jądrami komórkowymi (Fot. 30A). Oocyty wyraźnie różnią się od pozostałych komórek zespołu (od komórek odżywczych) (Fot. 30B). Jądro komórkowe oocytu jest owalne zlokalizowane w centralnej części komórki, zawiera jedno jąderko. Jąderko ma strukturę gąbczastą, niejednorodną, posiada przejaśnienia. Wokół jąder komórkowych obserwowano cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Fot. 31A). Na tym etapie oogenezy oocyty są znacznie większe od trofocytów. W ich cytoplazmie obecne są liczne kule żółtka różniące się od siebie wielkością i gęstością elektronową. Występują duże, kuliste struktury o średniej gęstości elektronowej. Posiadają one niejednorodną strukturę – obszary o mniejszej gęstości elektronowej. Dodatkowo w cytoplazmie obserwowano mniejsze struktury, niejednorodne o większej gęstości elektronowej z widocznymi przejaśnieniami oraz małe kule o średniej gęstości elektronowej (Fot. 30B, 31A, 32A, B). Oocyt nadal pozostaje połączony z trofocytem dzięki stabilnym mostkom międzykomórkowym. Mostki podobnie jak na wcześniejszych etapach posiadają dwie okładziny: zewnętrzną elektronowo gęstą przylegającą do oolemy i wewnętrzną o mniejszej gęstości elektronowej (Fot. 32A). Na terenie cytoplazmy mostków międzykomórkowych obserwuje się występowanie rybosomów, organelli komórkowych oraz kul żółtka (Fot. 32A). W cytoplazmie oocytów obserwowano pęcherzykowate struktury o elektronowo gęstej błonie. Struktury te pojawiły się na etapie środkowej witelogenezy, na etapie późnej witelogenezy pęcherzyki są większe i jest ich znacznie więcej. Ich powstawanie obejmuje formowanie pęcherzykowatych zagłębień błony komórkowej oocytu. W miejscach tych błona komórkowa oocytu charakteryzowała się większą gęstością elektronową (Fot.

33A). Struktury te sugerują endocytozę materiałów żółtkowych do wnętrza oocyty. Analiza ultrastruktury w mikroskopie elektronowym wykazała, że te pęcherzykowate struktury na terenie cytoplazmy oocyty wypełnione są kłaczkowatym materiałem o średniej gęstości elektronowej. Obserwowano fuzję tych struktur (Fot. 33B).

Na etapie choriogenezy w cytoplazmie oocyty obserwowano struktury o podwójnej, elektronowo gęstej błonie komórkowej wypełnione elektronowo jasnym materiałem (Fot. 34A, B).

Na późniejszych etapach choriogenezy obserwowano struktury przypominające ziarna korowe, układające się jedną warstwą tuż pod oolemmą (Fot. 34A). Barwienie czerwienią rutenu wykazało, że struktury te zawierają polisacharydy i mukopolisacharydy (Fot. 34A).

Na etapie choriogenezy oocyty zajmują znaczną część jamy ciała. Światło jelita środkowego jest puste, a samo jelito jest uciskane przez gonadę (Fot. 35A). Barwienia histochemiczne wykazały, że na tym etapie oogenezy na terenie oocytów obecne są lipidy (Fot. 35B), cukry (Fot. 35C) w tym polisacharydy i mukopolisacharydy (Fot. 35A, 36A) oraz białka (Fot. 35D).

Na etapie późnej witelogenezy u analizowanego gatunku rozpoczyna się proces choriogenezy. Wokół oolemmy oocytów gromadzą się granule o średniej gęstości elektronowej zawierające prekursorzy chorionu. Na początku choriogenezy granule nie łączą się ze sobą (Fot. 30B, 32A, B, 37A). W późniejszym czasie, materiał na chorion zlewa się w większe kuliste struktury, które są deponowane na powierzchni oolemmy. Powstają fragmenty chorionu o średniej gęstości elektronowej (Fot. 37B). Następnie fragmenty chorionu zlewają się i tworzą ciągłą warstwę na powierzchni oocyty (Fot. 37C).

W obrębie chorionu ostatecznie wyodrębniają się trzy warstwy: zewnętrzna i wewnętrzna warstwa chorionu o średniej gęstości elektronowej, oraz zlokalizowana pomiędzy nimi tzw. warstwa labiryntowa (Fot. 37D). Jako ostatnia formowana jest osłona żółtkowa. Powstaje ona po wykształceniu chorionu. Pomiedzy oolemmą, a chorionem tworzy się przestrzeń, w której deponowany jest kłaczkowaty materiał wydzielany w procesie egzocytozy przez oocyt. Materiał następnie ulega fuzji i tworzy elektronowo gęstą, ciągłą warstwę pod chorionem – osłonę żółtkową (Fot. 37E). W pełni wykształcona kapsuła jajowa składa się z trójwarstwowego chorionu o średniej gęstości elektronowej oraz elektronowo-gęstej osłony żółtkowej. Najgrubszą warstwą kapsuły jajowej jest warstwa wewnętrzna chorionu (endochorion), warstwa labiryntowa jest cieńsza od warstwy wewnętrznej chorionu, jednak

grubsza od warstwy zewnętrznej chorionu (egzochorionu), która jest najcieńsza. Warstwa zewnętrzna chorionu i osłona żółtkowa są podobnej grubości (Fot. 37E, 38A). Jaja *H. exemplaris* należą do jaj o gładkim chorionie. Nie posiadają żadnych wyrostków ani innych struktur charakterystycznych dla gatunków składających jaja o chorionie urzeźbionym (Fot. 38B). Jednakże obserwacja kapsuły jajowej w skaningowym mikroskopie elektronowym wykazała, że powierzchnia zewnętrzna chorionu *H. exemplaris* posiada delikatne pofałdowania (Fot. 39A). Na powierzchni jaj nie zaobserwowano żadnych charakterystycznych struktur takich jak np. mikropyle, hydropyle, aeropyle, wieczko, czy linia wylęgu. U analizowanego gatunku owipozycja jest ściśle połączona z linieniem (Fot. 39B). W trakcie składania jaj stara kutikula oddziela się od wytworzonej przez komórki nabłonkowe ściany ciała, nowej warstwy kutikuli (Fot. 40A). Na etapie późnej choriogenezy, gdy kapsuła jajowa jest całkowicie wykształcona, w mikroskopii elektronowej obserwowano dwie warstwy kutikuli pokrywające ciało zwierzęcia – starą grubszą, zlokalizowaną na zewnątrz ciała i nową cieńszą, leżącą tuż pod starą kutikulą (Fot. 41A).

Materiał na chorion u *H. exemplaris* powstaje przy udziale samego oocytu oraz komórek ściany jajnika. W trakcie choriogenezy, zaobserwowano wydzielanie przez oocyt na drodze egzocytozy prekursorów chorionu w postaci kłaczkowatego materiału (Fot. 42A, B, C). W cytoplazmie komórek ściany jajnika stwierdzono obecność cystern siateczki śródplazmatycznej (Fot. 43A), a także pęcherzyki zawierające kłaczkowaty materiał, który jest uwalniany na drodze egzocytozy do światła jajnika (Fot. 43B). Kłaczkowaty materiał o średniej gęstości elektronowej gromadzi się w sąsiedztwie błony apikalnej komórek ściany jajnika oraz w pobliżu błony oocytów (Fot. 44A, B).

Dojrzałe oocyty osiągają znaczne rozmiary i zajmują większą część jajnika. Dodatkowo jajnik wypełniony znacznych rozmiarów oocytami uciska jelito środkowe w wyniku czego dochodzi do zamknięcia jego światła (Fot. 17A, B, C, Film 3, Film 4). Barwienia histochemiczne osobników będących tuż przed owipozycją, wykazują, że w skład żółtka wchodzi polisacharydy (Fot. 45A), białka (Fot. 45B) oraz lipidy (Fot. 45C, Fot. 46A), podobnie jak na wcześniejszych etapach oogenezy. Wskazuje to, że w trakcie oogenezy wzrasta ilość żółtka, ale nie dochodzi do widocznych zmian w stosunku białek, polisacharydów i lipidów. Samica do końca owipozycji pozostaje w wylince, w której składa jaja. Następnie opuszcza wylinkę z jajami i rozpoczyna wędrówkę w poszukiwaniu pokarmu.

5.3.3.2. Trofocyty

Na etapie choriogenezy trofocyty wyraźnie różnią się od oocytów. Są od nich znacznie mniejsze i zawierają mniej materiałów zapasowych na terenie cytoplazmy w wyniku czego nie są one tak wyraźnie widoczne w mikroskopie świetlnym jak oocyty (Fot. 30A). Komórki mają kształt kulisty w części centralnej zlokalizowane jest jądro komórkowe (Fot. 30B). Jądro komórkowe jest okrągłe, zawiera jedno, duże, centralnie położone jąderko. Jąderko ma niejednorodną, gąbczastą strukturę, otoczone jest skupiskami heterochromatyny (Fot. 31B). Cytoplazma trofocytów zawiera rybosomy, liczne mitochondria z wyraźnymi grzebieniami, kule materiałów zapasowych, a także pęcherzykowate struktury o pojedynczej, elektronowo gęstej błonie wypełnione elektronowo jasnym materiałem (Fot. 31B). Materiał zapasowy jest zróżnicowany. Występują duże kule o średniej gęstości elektronowej, ale mniejsze niż te w cytoplazmie oocytów, mniejsze kule o dużej gęstości elektronowej, niejednorodne, z przejaśnieniami. Dodatkowo obecne są małe kule o średniej gęstości elektronowej (Fot. 30B, 31B). Trofocyty pozostają połączone stabilnymi mostakami międzykomórkowymi zarówno z oocytem (Fot. 32A) jak i z innymi trofocytami zespołu (Fot. 32B). Na terenie mostków cytoplazmatycznych obserwowano rybosomy, organella komórkowe oraz materiały zapasowe (Fot. 32A, B). Barwienia histochemiczne wykazały, że materiały zapasowe magazynowane na terenie trofocytów to lipidy (Fot. 35B), polisacharydy (Fot. 35C) oraz białka (Fot. 35D). Zastosowanie czerwieni rutenu wykazało, że mukopolisacharydy i polisacharydy są także obecne w cytoplazmie trofocytów (Fot. 36B). Ostatecznie w wyniku wzrastającej objętości oocytów trofocyty zostają zepchnięte pomiędzy oocyty tworząc charakterystyczne zgrupowania (Fot. 29A, 39B, Film 4). Tuż przed procesem owipozycji dochodzi do zamknięcia mostków pomiędzy oocytem, a trofocytami i śmierci komórkowej komórek odżywczych na drodze apoptozy co potwierdzono wykonując reakcję TUNEL (Fot. 47A).

5.4. Analiza zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych w trakcie oogenezy

Wolne przestrzenie jamy ciała niesporczaka wypełnione są płynem w którym swobodnie pływają ciała spichrzowe (Film 1, Film 2, Fot. 8AB; Fot. 37B). U badanego gatunku *H.*

exemplaris zaobserwowano zmiany w ultrastrukturze ciałek spichrzowych skorelowane ze zmianami zachodzącymi na terenie jajnika. Na etapie prewitelogenezy w centralnej części komórki zlokalizowane jest kuliste jądro komórkowe. Jądro komórkowe posiada pojedyncze jąderko otoczone skupiskami heterochromatyny. Ciała spichrzowe magazynują pojedyncze kule elektronowo-gęstego materiału. Cytoplazma ciałek spichrzowych na tym etapie oogenezy jest uboga w organella komórkowe, obserwowano głównie rybosomy i mitochondria z wyraźnymi grzebieniami (Fot. 48A). Wraz z rozpoczęciem magazynowania materiałów zapasowych w komórkach linii płciowej znajdujących się w witelarium (czyli na etapie wczesnej witelogenezy) obserwowano zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych. Komórki te zaczynają intensywnie akumulować materiały zapasowe. W ich cytoplazmie obserwowano heterogenne kule materiałów zapasowych posiadające część korową o większej gęstości elektronowej i jaśniejszą część rdzenną. W cytoplazmie obecne są także mitochondria, rybosomy oraz cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Fot. 48B). Wraz z postępowaniem procesu oogenezy (środkowa witelogeneza) obserwowano postępujące zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych. Centralną część cytoplazmy ciałek spichrzowych zajmuje jądro komórkowe. Jądro komórkowe posiada duże kuliste jąderko o heterogennej strukturze otoczone skupiskami heterochromatyny. W cytoplazmie ciałek spichrzowych wyraźnie wzrasta ilość szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i rybosomów. Ponadto zaobserwowano także wzrost liczby kul materiałów zapasowych o różnej gęstości elektronowej. Największe heterogenne kule mają elektronowo gęstszą korę i elektronowo jaśniejszy rdzeń. Ponadto obserwowano kule o mniejszej gęstości elektronowej i małe kule o średniej gęstości elektronowej (Fot. 49A). Materiał zapasowy w cytoplazmie ciałek spichrzowych jest intensywnie magazynowany do etapu choriogenezy, czyli do późnej witelogenezy. Wówczas obserwowano największą liczbę kul materiałów zapasowych w cytoplazmie ciałek spichrzowych. Na tym etapie w centralnej części cytoplazmy ciałek spichrzowych znajduje się jądro komórkowe. Jądro komórkowe posiada duże kuliste jąderko o heterogennej strukturze otoczone skupiskami heterochromatyny. Co więcej obserwowano także wakuole jąderkowe w jąderku. Na terenie cytoplazmy występuje wyraźny wzrost liczby kul materiałów zapasowych o różnych gęstościach elektronowych. Największe kule o heterogennej budowie - elektronowo gęstszej korze i elektronowo jaśniejszym rdzeniu, mniejsze o średniej gęstości elektronowej i najmniejsze o dużej gęstości elektronowej (Fot. 50A). Wykonane reakcje histochemiczne wykazały, że materiał gromadzony na terenie ciałek

spichrzowych w trakcie oogenezy to polisacharydy (Fot. 51A), białka (Fot. 51B) oraz lipidy (Fot. 51C, D).

6. DYSKUSJA

Pierwszy, prosty opis gonady żeńskiej niesporczaka pojawił się w 1840 roku dzięki Doyère'owi. Prawie sto lat później Marcus (1928) opisał proces gromadzenia żółtka w komórkach jajnika gatunku *Macrobiotus hufelandii* używając do swoich badań mikroskopu świetlnego. W drugiej połowie XX wieku pojawiło się kilka opisów morfologicznych żeńskiej gonady niesporczaka (Baumann 1964; Renaud-Dobysier 1965; Pollock 1970; Grimaldi de Zio i in. 1987). Obecnie dzięki dostępności coraz nowocześniejszych metod i aparatury, które znacznie ułatwiają badania na tak małych zwierzętach jakimi są niesporczaki, pojawia się coraz więcej publikacji dotyczących nie tylko ogólnej budowy jajnika, ale także szczegółowych zmian ultrastrukturalnych jakie zachodzą w trakcie procesu oogenezy u tych drobnych bezkręgowców. Dotąd w literaturze znajduje się kilka publikacji dotyczących samej organizacji jajnika, zmian ultrastrukturalnych związanych z procesem oogenezy, formowania się osłon jajowych, czy losu komórek jajnika. Wszystkie przeanalizowane gatunki niesporczaków należą do gromady Eutardigrada, rzędu Parachela, poza jednym wyjątkiem jakim jest *Milnesium tardigradum* (Suzuki 2006) należące do gromady Eutardigrada, rzędu Apochela. Badania te zostały przeprowadzone dla gatunków: *Paramacrobiotus richtersi* (Macrobiotidae; Węglarska 1979, 1982), *Dactylobiotus dispar* (Murrayidae; Poprawa 2005a, 2005b), *Milnesium tardigradum* (Milnesiidae; Suzuki 2006), *Isohypsibius granulifer granulifer* (Isohypsibiidae; Węglarska 1987, Poprawa 2011, Poprawa i in. 2015a), *Dactylobiotus parthenogeneticus* (Murrayidae; Poprawa i in. 2015b), *Macrobiotus polonicus* (Macrobiotidae; Poprawa i in. 2015c).

Badany gatunek *Hypsibius exemplaris* został uznany w roku 2007 jako nowy gatunek modelowy. W ostatnich latach stał się obiektem licznych badań na przeróżnych polach naukowych takich jak biologia rozwoju, fizjologia, biologia komórki, genetyka i genomika, filogenetyka, anatomia, a także astrobiologia (Gabriel i in. 2007; Gabriel i Goldstein 2007; Boothby i in. 2015; Beltrán-Pardo i in. 2013; Tenlen i in. 2013; Smith i Jockusch 2014; Gross i Mayer 2015; Arakawa i in. 2016; Bemm i in. 2016; Hyra i in. 2016a, 2016b; Fernandez i in. 2016; Hering i in. 2016; Koszyła i in. 2016; Stec i in. 2016; Erdmann i in. 2017; Gross i in. 2017; Levin i in. 2016; Smith i in. 2017, Yoshida i in. 2017; Gross i in. 2018). W niniejszej

pracy skupiono się na anatomii układu rozrodczego badanego gatunku oraz na przebiegu procesu oogenezy.

Gonada *H. exemplaris* jest strukturą pojedynczą zlokalizowaną w części grzbietowej zwierzęcia, podobnie jak ma to miejsce u większości opisanych dotąd niesporczaków (Węglarska 1979, 1987; Bertolani 1983; Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Poprawa 2005a; Poprawa i Grzywa 2006; Suzuki 2006; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c; Nelson i in. 2015). Wyjątek wśród Tardigrada stanowi *Carphania fluviatilis*, u którego zaobserwowano parzyste, duże gonady zlokalizowane po bokach jelita (Binda i Kristensen 1986). Gonada w okresie embrionalnym u niesporczaków rozwija się z parzystych zawiązków (Nelson 1982), jednak u osobników dorosłych (żeńskich, męskich oraz hermafrodytycznych) jest strukturą nieparzystą. Nieparzysta gonada nie jest rzadkością wśród zwierząt. Występuje u takich grup jak wrotki (Rotifera) (Gilbert 1983), szczękogębe (Gnathostomulida) (Mainitz 1983), wiję (Myriapoda) (Sareen i Adiyodi 1983, Kubrakiewicz 1991a, 1991b), wrzęchy (Pentastomida) (Nørrevang 1983), a także u niektórych nicieni (Nematoda) (Foor 1983), czy skorupiaków (Crustacea) (Adiyodi i Subramonien 1983).

Jajnik niesporczaków znajduje się po grzbietowej stronie ciała nad jelitem. W części szczytowej (dogłowej) jest przytwierdzony do ściany ciała za pomocą specjalnej struktury zwanej filamentem terminalnym. Filament terminalny różni się budową u poszczególnych gromad. U Heterotardigrada posiada jedną wypustkę (nić), która przytwierdza go do ściany ciała, natomiast u Eutardigrada są to dwie nici (Węglarska 1979, 1987; Bertolani 1983; Dewel i in. 1993; Poprawa 2005a, 2005b; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c). Nici filamentu mogą stanowić wypustki cytoplazmatyczne komórek budujących ścianę jajnika (Węglarska 1987; Poprawa i in. 2015b) lub niewielkie włókna mięśniowe (Dewel i in. 1993). U badanego gatunku *H. exemplaris* jajnik połączony jest ze ścianą ciała za pomocą dwóch nici filamentu terminalnego (podobnie jak ma to miejsce u pozostałych przedstawicieli Eutardigrada), które są wypustkami cytoplazmatycznymi komórek tworzących ścianę jajnika. Filamenty terminalne są strukturami obserwowanymi także wśród owadów (Insecta) jednak w przeciwieństwie do filamentów niesporczaków u owadów są to twory wielokomórkowe (Biliński i Szklarzewicz 1992; Simiczyjew i in. 1998; Kisiel i Klag 2001; Lupa i in. 1999; Lupa 2002).

Pojedynczy jajnik *H. exemplaris* w swojej tylnej części bez wyraźnej granicy przechodzi w pojedynczy jajowód, mniej więcej na wysokości przejścia jelita środkowego w jelito tylne. Jajowód uchodzi do światła jelita tylnego łącząc się z nim w jego grzbietowej części, inaczej

niż ma to miejsce u gatunku *D. parthenogeneticus*, u którego jajowód uchodzi do jelita po jego brzusznej stronie (Poprawa i in. 2015b). U badanego gatunku występuje więc kloaka będąca odcinkiem wspólnym dla układu rozrodczego i pokarmowego. Ujście kloaki zlokalizowane jest po stronie brzusznej ciała pomiędzy trzecią, a czwartą parą odnóży. Obecność kloaki jest charakterystyczna dla niesporczaków należących do gromady Eutardigrada (Marcus 1929; Węglarska 1979, 1987; Bertolani 1983; Kinchin 1994; Poprawa 2005a, 2005b; Poprawa i Grzywa 2006; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c), jej występowanie opisano także dla jednego z przedstawicieli gromady Heterotardigrada *C. fluviatilis* (Binda i Kristensen 1986). Gatunek ten stanowi więc wyjątek wśród pozostałych gatunków należących do gromady Heterotardigrada, u których układ rozrodczy oraz pokarmowy posiadają niezależne ujścia – odpowiednio: gonopor i odbyty (Dewel i in. 1993; Kinchin 1994; Nelson i in. 2015).

Ścianę jajnika *H. exemplaris*, podobnie jak innych niesporczaków buduje jednowartswowy nabłonek płaski. Komórki budujące ten nabłonek pochodzą z linii somatycznej, wsparte na blaszce podstawnej, a swoją apikalną częścią zwrócone są ku światłu gonady (Węglarska 1979, 1982, 1987; Bertolani 1983; Poprawa 2005a, 2005b; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c). W trakcie oogenezy, gdy komórki wypełniające jajnik (oocyty i trofocyty) zwiększają swoją objętość, dochodzi do rozciągania ściany gonady. Komórki ulegają spłaszczeniu i rozciągnięciu. Komórki ściany jajnika *H. exemplaris* tworzą wypustki cytoplazmatyczne skierowane do światła gonady, penetrujące pomiędzy komórki linii płciowej jajnika. Podobne struktury obserwowano także u innych gatunków niesporczaków: *I. g. granulifer* (Poprawa i Grzywa 2006; Poprawa i in. 2015a), *D. dispar* (Poprawa 2005a), *D. parthenogeneticus* (Poprawa i in. 2015b), czy też u *P. richtersi* (Węglarska 1979, 1982), ale są one także spotykane u innych grup zwierząt np. u przedstawiciela nicieni *Xiphinema thersiae* (Nematoda) (van de Velde i Coomans 1988). Co warto podkreślić, wypustki ściany gonady występują w części żeńskiej, natomiast nie występują w części męskiej gonady u hermafrodytycznego gatunku *I. g. granulifer* (Poprawa i Grzywa 2006; Poprawa i in. 2015a).

W obrębie gonad niesporczaków występują strefy. U wszystkich niesporczaków występuje niewielka strefa zwana germarium, wypełniona niezróżnicowanymi komórkami linii płciowej – oogoniami. U analizowanego gatunku *H. exemplaris* germarium jest pierwszą strefą gonady, zlokalizowaną szczytowo. Podobna sytuacja występuje u partenogenetycznych gatunków *D. dispar* (Poprawa 2005a), *D. parthenogeneticus* (Poprawa 2015b), *M. polonicus*

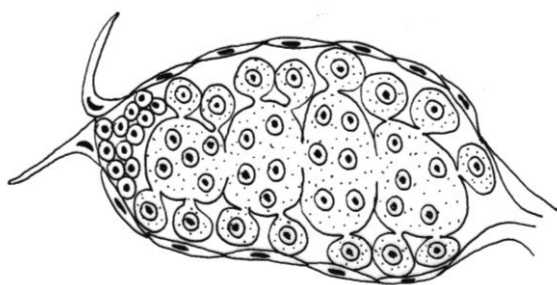
(Poprawa i in. 2015c), *T. ruffoi* (Janelt 2017), a także u hermafrodytycznego gatunku *I. g. granulifer* (Węglarska 1987, Poprawa i in. 2015a). Co ciekawe jak podaje Węglarska u *P. richtersi* (Węglarska 1975; 1979) germarium może być zlokalizowane nie szczytowo, a ekscentrycznie w stosunku do jajnika i tworzyć wąski klin bądź też 2 - 3 wysepki komórek. Druga strefa – witelarium, znacznie większa, zajmuje pozostałą część gonady. Witelarium wypełniają dojrzewające komórki płciowe. U gatunków partenogenetycznych występują tylko komórki linii żeńskiej z kolei u gatunków rozdzielнопłciowych (gonochorycznych) samice posiadają germarium i witelarium, gdzie jest obecna strefa komórek linii żeńskiej, natomiast samce posiadają w miejscu witelarium strefę wypełnioną komórkami linii męskiej (np. *Macrobiotus hufelandi*, *Hypsibius convergens*, *Isohypsibius baicalensis*). Gatunki hermafrodytyczne posiadają w gonadzie germarium oraz strefy z komórkami żeńskimi (witelarium) i komórkami męskimi; strefy te nie są od siebie odseparowane (np. *I. g. granulifer*, *B. weglarskae*, *M. joannae*) (Marcus 1929; Bertolani 1976, 1979; Bertolani i in. 1983; Węglarska 1987; Poprawa i Grzywa, 2006; Poprawa i Galus 2007; Nelson i in. 2015). Brak wyraźnego oddzielenia komórek linii żeńskiej i męskiej w gonadzie opisano także u ślimaków płucodysznych (Pulmonata) (Kubrakiewicz 1985).

Ogólny plan budowy jajnika niesporczaków jest bardzo podobny do owarioli politroficznej występującej u owadów (Insecta). Zarówno u niesporczaków jak i u owadów obecny jest filament terminalny, dodatkowo wyróżnia się dwie strefy – germarium i witelarium. Co więcej w witelarium komórki płciowe różnicują się w oocyty i trofocyty, które wspomagają rozwój oocytów (Biliński i in. 2017). W jajniku niesporczaków brak natomiast komórek folikularnych tak charakterystycznych dla owadów (Büning 1994), oraz obecnych także u pazurnic (Onychophora) (Erwin i Donald 1994). Podobna sytuacja (brak komórek folikularnych) występuje u takich grup zwierząt jak nicienie (Nematoda) (Foor 1983), wrzęchy (Pentastomida) (Nørrevang 1983), rurkoczulkowce (Siboglinidae) (Bakke 1983), splewki (Branchiura) (Kubrakiewicz i Klimowicz 1994), muszloraczki (Conchostraca) (Klimowicz 2002), tarczowce (Notostraca) (Trentini i Scanabissi 1979), dziesięcionogi (Decapoda) (Ando i Makioka 1999), a także widłonogi (Copepoda) (Adiyodi i Subramonien 1983). Zupełnie inaczej sytuacja wygląda u pazurnic (Onychophora) – siostrzanej grupy dla Tardigrada, u których wyróżnia się aż trzy typy jajników: jajnik egzogeniczny, pseudoendogeniczny oraz endogeniczny. We wszystkich typach jajników oocyty wywodzą się z linii komórek płciowych, z nabłonka płciowego. Wszystkie pazurnice są gatunkami rozdzielнопłciowymi. U pazurnic nie występują jednak komórki odżywcze (trofocyty), które

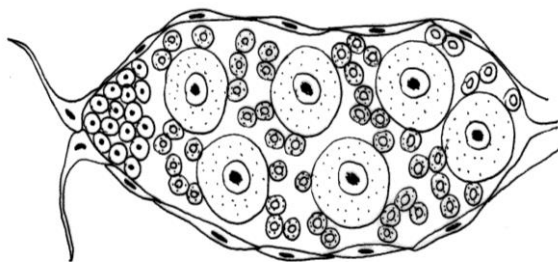
są obecne zarówno u wielu gatunków owadów jak i u niesporczaków. Biorąc więc pod uwagę budowę jajnika pazurnic jest to jajnik panoistyczny (Erwin i Donald 1994; Jura 2007; Mayer 2007; Mayer i Harzsch 2008; Norman i Tait 2008; Mayer i Tait 2009).

Na terenie witelarium *H. exemplaris* znajdują się zespoły żeńskich komórek płciowych, powstające w trakcie podziałów komórkowych w wyniku niepełnych cytokinez. W obrębie zespołu komórek linii żeńskiej wyróżnić można dwie populacje komórek – oocyt, czyli komórkę, która rozwinie się w komórkę jajową, oraz trofocyty będące komórkami odżywczymi. Obecność zespołów komórkowych w gonadach jest zjawiskiem powszechnym dotyczy np. owadów (Insceta), pierścienic (Annelida), nicieni (Nematoda), płazińców (Platyhelminthes), niektórych skorupiaków (Crustacea), ale także kręgowców (Fernández i in. 1992; Biliński 1994; Kubrakiewicz 1999; Pepling i in. 1999; Matova i Cooley 2001; Świątek 2008; Świątek i in. 2009, 2012; Gorgoń i in. 2015; Małota i in. 2018). Budowa zespołu żeńskich komórek płciowych opisana została tylko dla dwóch gatunków niesporczaków. Oba badane gatunki należą do tej samej gromady Eutardigrada, ale różnych rzędów. *M. tardigradum* to przedstawiciel rzędu Apochela (Suzuki 2006), natomiast *D. parthenogeneticus* należy do rzędu Parachela (Poprawa i in. 2015b). W obu przypadkach w witelarium obecne są zespoły żeńskich komórek płciowych, jednak organizacja tych zespołów jest zupełnie różna.

U obu analizowanych gatunków niesporczaków zespoły komórek płciowych są typu rozgałęzionego. W witelarium *M. tardigradum* zlokalizowany jest jeden 108 komórkowy zespół komórek płciowych zbudowany z czterech, centralnie położonych, wielojądrowych trofocytów połączonych ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi. Trofocyty otoczone są 104 jednojądrowymi komórkami, które łączą się z trofocytami pojedynczymi mostkami międzykomórkowymi (Ryc. A.). Część jednojądrowych komórek różnicuje się w oocyty, a część pełni funkcję trofocytów (Suzuki 2006). Z kolei w jajniku *Dactylobiotus parthenogeneticus* obecna jest zmienna liczba zespołów żeńskich komórek płciowych. Liczba zespołów w jajniku zależy od wieku samicy oraz jej kondycji fizycznej. Rozgałęziony zespół komórek płciowych u *D. parthenogeneticus* zbudowany jest z 8 komórek połączonych ze sobą mostkami cytoplazmatycznymi. Wszystkie komórki zespołu są jednojądrowe i w obrębie jednego zespołu komórek płciowych tylko jedna komórka (posiadająca największą liczbę mostków międzykomórkowych, czyli 4 mostki) różnicuje się w oocyt. Pozostałe 7 komórek zespołu pełni funkcję komórek odżywczych (Ryc. B.) (Poprawa i in. 2015b).



Ryc. A.



Ryc. B.

Rycina 2. A. zespół komórek płciowych *Milnesium tardigradum* (Apochela); B. zespół komórek płciowych *Dactylobiotus parthenogeneticus* (Parachela).

M. tardigradum wraz z *Halechiniscus perfectus* są jedynymi znanymi gatunkami należącym do Tardigrada u których zaobserwowano w obrębie zespołu komórek płciowych wielojądrowe komórki (Dewel i in. 1993; Suzuki 2006). Takie wielojądrowe twory w gonadzie opisane są także u innych zwierząt np. u ogonicy (*Oikopleura dioica*), gdzie w jednej wielojądrzastej komórce obecne są jądra komórkowe przyszłych oocytów, a także komórek odżywczych (Gannot i in. 2007a). Pozostałe gatunki niesporczaków u których analizowano strukturę gonady: *D. dispar* (Poprawa 2005a, 2005b), *I. g. granulifer* (Węglarska 1987; Poprawa 2011; Poprawa in. 2015a), *M. polonicus* (Poprawa i in. 2015c), *D. parthenogeneticus* (Poprawa i in. 2015b), *T. ruffoi* (Janelt i in. 2018) wykazują organizację zespołu komórek płciowych podobną do tej zaobserwowanej u *D. parthenogeneticus* – zespoły komórek płciowych są typu rozgałęzionego i wszystkie komórki zespołu są komórkami jednojądrowymi. Co ciekawe z wstępnych badań nad *T. ruffoi* wynika, że zespół komórek płciowych jest typu rozgałęzionego, wszystkie komórki są jednojądrowe, ale liczba komórek w zespole sięga nawet 35. Z przeprowadzonych w trakcie doktoratu badań wynika, że *H. exemplaris* posiada zespół komórek płciowych również typu rozgałęzionego i wszystkie komórki zespołu są jednojądrowe. Dokładna organizacja komórek w zespole oraz lokalizacja mostków niestety wymaga dalszych badań, jednak z przeprowadzonych analiz wnioskuje się, że liczba komórek w pojedynczym zespole u *H. exemplaris* jest bliższa tej występującej u *D. parthenogeneticus* - między 10, a 12. Podanie dokładnej liczby komórek budujących zespół wymaga jednak analizy większej liczby osobników i dopracowania metody utrwalania do

SBEM. Liczba zespołów komórek płciowych *H. exemplaris* jest zmienna i zależy od wieku oraz kondycji zwierzęcia. W trakcie kilkuletniej hodowli laboratoryjnej wspomnianego wyżej gatunku zaobserwowano, że młode osobniki posiadały małą liczbę zespołów komórek płciowych, tym samym składały małą liczbę jaj do wylinki (pierwsza owipozycja zwykle 1 - 2 jaja). Z każdym następnym procesem oogenezy liczba zespołów komórek płciowych w jajniku wzrastała co pociągało za sobą wzrost liczby składanych jaj. Największa liczba złożonych jaj w hodowli to 10, podczas gdy u *T. ruffoi* obserwowano wylinki zawierające nawet 24 jaja (Janelt 2017). Starsze osobniki składały jaja coraz rzadziej i w coraz mniejszej liczbie.

Komórki zespołu *H. exemplaris* są jednojądrowe, połączone ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi. W obrębie jednego zespołu komórki różnicują się w oocyty i trofocyty. Jajnik analizowanego gatunku należy więc uznać za jajnik meroistyczny. Jajnik meroistyczny charakteryzuje się tym, że tylko część komórek linii płciowej różnicuje się w oocyty, a pozostałe pełnią funkcje odżywcze w przeciwieństwie do jajnika panoistycznego, gdzie wszystkie komórki linii płciowej mają potencjał by stać się oocytem (Büning 1994; Büning 2006; Jaglarz i in. 2014a; Biliński i in. 2017). Badania ultrastrukturalne wykazują, że oogeneza meroistyczna występuje także u innych niesporczaków, zarówno należących do gromady Eutardigrada (Węglarska 1979, 1982, 1987; Poprawa 2005a; Poprawa i Grzywa 2006; Suzuki 2006; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2014, 2015a, 2015b, 2015c) jak i Heterotardigrada (Dewel i in. 1993). Jajniki meroistyczne występują dość często w świecie zwierząt np. u skoczogonków (Collembola), niektórych widłogonków (Diplura: Campodeidae) (Büning 1994, 2006); u muchówek (Diptera) (Büning 1994, 2006; Jaglarz i in. 2010), w tym komarowatych (Culicidae) (Büning 1994; Soumaré, Ndiaye 2005), u sieciarek (Neuroptera) (Kubrakiewicz 1997), wszy i wszołów (Phthiraptera) (Zawadzka i in. 1997; Żelazowska 2005), pluskwiaków (Hemiptera) (Vogelgesang i Szklarzewicz 2001; Szklarzewicz i in. 2005; Michalik i in. 2013; Özyurt i in. 2013) i skorków (Dermaptera) (Tworzydło i Biliński 2008). Ponadto jajniki meroistyczne występują także u niektórych skorupiaków (Crustacea: Branchiopoda; Podocopa) (Kubrakiewicz 1994; Jaglarz i in. 2014a, 2014b; Garbiec i in. 2016) i siodełkowców (Clitellata) (Świątek i in. 2016; Świątek 2008; Urbisz, Świątek 2013; Urbisz i in. 2015; Świątek i in. 2016).

Ze względu na obecność lub brak w jajniku meroistycznym, specjalnej strefy troficznej (odżywczej), wypełnionej komórkami odżywczymi (trofocytami) wyróżnia się jajnik meroistyczny – telotroficzny i meroistyczny – politroficzny. W jajniku meroistycznym –

telotroficznym obecna jest strefa troficzna (zwana trofarium), wypełniona tylko komórkami odżywczymi (trofocytami), które łączą się z oocytami za pomocą długich wypustek cytoplazmatycznych zwanych sznurami odżywczymi, które są wydłużonymi mostkami cytoplazmatycznymi (Büning 1994, 2006; Michalik i in. 2013; Biliński i in. 2017). W jajniku meroistycznym – politroficznym trofarium nie występuje, trofocyty otaczają oocyty i przesuwały się wraz z nimi wzdłuż owarioli. Co więcej w jajniku meroistycznym – politroficznym oocytom towarzyszą także komórki folikularne, które otaczają oocyt wraz z jego aparatem odżywczym. Jajniki meroistyczne – politroficzne występują np. u skoczogonków (Collembola), niektórych widłogonków (Diplura: Campodeidae) a także owadów, takich jak: sieciarki (Neuroptera), skorki (Dermaptera), muchówki (Diptera), wszy i wszóły (Phthiraptera), chruściki (Trichoptera), czy u niektórych chrząszczy (Archostemata: Micromalthidae; Adephaga) (Büning 1994, 2006; Kubrakiewicz 1997a; Zawadzka i in. 1997; Żelazowska 2005; Tworzydło i Biliński 2008). Zarówno u badanego gatunku niesporczaka *H. exemplaris* jak i u pozostałych gatunków Tardigrada u których analizowano budowę jajnika, jajnik ma charakter meroistyczny – politroficzny. Oocytom towarzyszą komórki odżywcze (trofocyty), które nie tworzą trofarium, ale otaczają dojrzewające oocyty. U niesporczaków brak jest jednak komórek folikularnych, które otaczałyby zespoły komórek płciowych (Węglarska 1979, 1982; Poprawa 2005a; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c). Podobna sytuacja występuje także u niektórych skorupiaków jak np. tarczowce (Notostraca) (Trentini i Scanabissi 1979), czy małżoraczki (Ostracoda) (Kubrakiewicz i Klimowicz 1995; Klimowicz 2002). Mimo, że u niesporczaków nie ma komórek folikularnych to podobną funkcję pełnią u Tardigrada komórki ściany gonady – otaczają zespoły komórek płciowych zlokalizowane w jajniku, swoją częścią apikalną są zwrócone do komórek płciowych, a ich część bazalna skierowana jest na zewnątrz gonady, ich wypustki penetrują do wnętrza jajnika pomiędzy komórki linii płciowej, co więcej uczestniczą w procesie choriogenezy syntezując i wydzielając materiał na jedną z osłon jajowych (chorion). Dodatkowo komórki ściany jajnika niesporczaków, podobnie jak komórki folikularne wywodzą się z linii somatycznej. Biorąc więc pod uwagę pochodzenie komórek ściany gonady niesporczaków, ich orientację względem komórek linii płciowej oraz funkcje jakie pełnią można je uznać za odpowiedniki komórek folikularnych występujących u owadów (Biliński i Klag 1977; Mazzini i Gaino 1988; Gaino i Mazzini 1990; Kaulenas 1992; Rościszewska 1995, 1996; Poprawa 2002).

Wśród niesporczaków znane są różne typy rozmnażania, począwszy od rozdzielnopłciowości, przez hermafrodytyzm do partenogenezy. Co więcej niektóre gatunki

rozdzielnopłciowe wykazują także zdolność do rozmnażania na drodze partenogenezy (Węglarska 1987; Poprawa i Galus 2007; Kaczmarek 2013). Z danych literaturowych wynika, że gatunek *Hypsibius dujardini* w naturalnym środowisku jest rozdzielnopłciowy (występują osobniki męskie i żeńskie). Liczebność osobników męskich zmienia się w trakcie roku (Marcus 1929). Z drugiej strony Ammerman (1967) w hodowli obserwował rozmnażanie *H. dujardini* na drodze partenogenezy. Do gatunków rozdzielnopłciowych należą między innymi: *M. hufelandii* (Marcus 1929), *H. convergens* (Baumann 1961), *P. megalonyx* (Bertolani 1976), *M. polonicus* (Poprawa 2015c). Zapłodnienie u nich może być zewnętrzne (np. *P. megalonyx*) jak i wewnętrzne (*M. hufelandii*) (Nelson 1982). Wśród gatunków rozdzielnopłciowych występuje mniej lub bardziej widoczny dymorfizm płciowy - różnica w wielkości osobników przeciwnych płci, morfologia i wielkość pazurków czy różnica w kształcie gonoporu (Rebecchi i in. 2000; Bertolani 2001; Nelson i in. 2010). Gatunki hermafrodytyczne są rzadkie wśród Eutardigrada. Należą do nich między innymi: *I. g. granulifer* (Węglarska 1987, Poprawa i in. 2015a), *I. baicalensis* (Bertolani 1979), *B. weglarskae* (Dastych 1972), *M. joannae* (Bertolani 1979), zwykle są to niesporczaki słodkowodne i lądowe. Wśród niesporczaków morskich hermafrodytyzm opisano tylko u jednego gatunku *Orzeliscus* cf. *belopus* znalezionego przez Kristensena w Egipcie na głębokości 2 - 3 metrów (Bertolani 1987). Partenogeneza jak dotąd nie została opisana wśród gatunków morskich, ten typ rozmnażania jest popularny wśród gatunków lądowych i limnologicznych, czyli żyjących w środowiskach o niestabilnych warunkach (Nelson i in. 2015). Dodatkowo wśród Tardigrada wyróżnić można gatunki iteroparyczne, które są zdolne w trakcie swojego życia do wielokrotnego rozmnażania. Do nich należy zdecydowana większość gatunków niesporczaków. Gatunki sempelparyczne – u których proces rozmnażania zachodzi raz w życiu, są zdecydowanie rzadsze. Należy tu np. *P. megalonyx* (osobniki męskie) (Rebecchi i Bertolani 1994; Bertolani 2001).

W trakcie czterech lat prowadzenia ciągłej hodowli laboratoryjnej, badany gatunek *H. exemplaris* rozmnażał się partenogenetycznie, a wszystkie analizowane osobniki były samicami. W swoich pracach Węglarska (1979, 1987) sugeruje, że oogeneza niesporczaków nie jest procesem ciągłym, a witelarium w pewnym okresie może być puste. Jednakże badania prowadzone w ramach doktoratu na gatunku *H. exemplaris* wskazują, że proces oogenezy w jajniku tego niesporczaka jest procesem ciągłym. Podczas gdy zespoły w witelarium były na zaawansowanym etapie oogenezy, w części szczytowej obserwowano cystocyty na etapie wczesnej witelogenezy. Wskazuje to na fakt, że w gonadzie, a dokładniej w witelarium *H.*

exemplaris współistnieją zespoły komórkowe na różnych etapach oogenezy. Podobną sytuację zaobserwowano dla gatunku *T. ruffoi* (Janelt 2017), u którego obserwowano cystocyty prewitelogeniczne w trakcie późnej oogenezy, a także cystocyty wczesnowitelogeniczne tuż po owipozycji.

W trakcie procesu oogenezy zmiany ultrastrukturalne zachodzące w komórkach zespołu żeńskich komórek płciowych pozwalają na wyróżnienie następujących charakterystycznych etapów: prewitelogenezy, witelogenezy, choriogenezy.

Bardzo młode, niezróżnicowane komórki linii płciowej żeńskiej charakteryzują się prostą ultrastrukturą. Ich cytoplazma zawiera nieliczne mitochondria, rybosomy, śladowe ilości RNA oraz nieliczne, krótkie cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Biliński i Klag 1994; Kubrakiewicz 1997b). Prewitelogeneza to okres, gdy cytoplazma komórek zespołu podlega dynamicznym zmianom. Po wejściu komórek w prewitelogenezę w ich cytoplazmie następuje intensywny wzrost i synteza dużych ilości makromolekuł (np. rRNA, mRNA), białek, rybosomów oraz gromadzenie organelli komórkowych. rRNA może być syntetyzowane w różnoraki sposób, albo przez sam oocyt, albo przez komórki, które wspomagają rozwój oocytu (komórki odżywcze – trofocyty) pochodzące z linii płciowej, bądź też wyspecjalizowane komórki linii somatycznej (Büning 1994; Kubrakiewicz 1997b; Matova i Cooley 2001; Tworzydło i Biliński 2008; Tworzydło i Kisiel 2009; Poprawa 2005a; Rost-Roszkowska i in. 2011; Jaglarz i in. 2014b; Poprawa i in. 2015b, 2015c). Podobne zmiany dotyczą także komórek płciowych dojrzewających w jajnikach panoistycznych, czyli tych w których brak jest komórek odżywczych (Klag 1978).

Zmiany zachodzące w trakcie prewitelogenezy w komórkach linii płciowej żeńskiej analizowanego gatunku *H. exemplaris* wykazuje podobieństwo do zmian opisanych na tym etapie u innych niesporczaków (Węglarska 1975, 1987; Poprawa 2005a; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015a, 2015b, 2015c, Janelt 2017). Komórki w witelarium połączone są ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi dzięki czemu powstają zespoły komórkowe. Na tym etapie oogenezy wszystkie komórki zespołu charakteryzują się podobnym kształtem, wielkością oraz ultrastrukturą. Komórki zaczynają intensywnie wzrastać. Obserwowano duże jądro komórkowe posiadające dość duże jąderko o gąbczastej, heterogennej strukturze. Jedną z podstawowych funkcji trofocytów jest synteza rRNA na terenie jąder komórkowych, który następnie jest transportowany do wzrastającego oocytu przez mostki międzykomórkowe (Büning 1994; Raška i in. 2006). Aktywność transkrypcyjna jąderek przejawia się w ich ultrastrukturze, są duże, heterogenne o dużej gęstości

elektronowej, często posiadają wakuole jąderkowe (Węglarska 1979; Olszewska 1983; Biliński 1993; Raška i in. 2006, Czernekova i in. 2018). Heterogenne jąderka komórkowe obserwowano u *P. richtersi* (Węglarska 1979), co zdaniem Węglarskiej świadczy o ich wzmożonej aktywności.

W chwili pojawienia się w cytoplazmie pierwszych elektronowo-gęstych kul materiału zapasowego (żółtka) kończy się prewitelogeneza, a rozpoczyna witelogeneza. Termin „witelogeneza” oznacza zarówno sam proces syntezy i gromadzenia żółtka, jak i określa fazę oogenezy w trakcie której dochodzi do gromadzenia materiałów zapasowych (żółtka) (Szklarzewicz 1994). W skład żółtka wchodzić mogą białka, lipidy, polisacharydy, oraz inne mniejsze składniki (Atella i in. 2005). Formowanie żółtka może się odbywać na kilku drogach, w wyniku procesów endogennych (autosyntezy), egzogennych (heterosyntezy), bądź też jako efekt współdziałania obu procesów jednocześnie - wówczas synteza żółtka ma charakter mieszany. Autosynteza materiałów żółtkowych zachodzi na terenie samego oocytu, natomiast w wyniku heterosyntezy żółtko syntetyzowane jest poza oocytem (Biliński 1977; Biliński 1979; Szklarzewicz 1994; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015b). Uważa się, że autosynteza żółtka jest pierwotniejszym procesem, spotyka się ją u grup zwierząt stojących nisko w systematyce, np. u gąbek (Spongaria), parzydełkowców (Cnidaria), robaków płaskich (Platyhelminthes), brzuchorzęsków (Gastrotricha), czy niezmogowców (Priapulida) (Fell 1983; Beams i Kessel 1983; Hummon i Hummon 1983; Nørrevang 1983; Szklarzewicz 1994). W procesie autosyntezy żółtko może powstawać albo „wolno w cytoplazmie” albo jego synteza może być związana z konkretnym organellem jak np. z mitochondriami, diktiosomami czy wewnątrz cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (Biliński 1976, 1979; Klag 1978; Nørrevang 1983; Spałek – Wołczyńska 2002, Spałek-Wołczyńska i in. 2008).

Heterosyntezę uważa się za dominujący sposób gromadzenia materiałów zapasowych w trakcie oogenezy zarówno u organizmów bezkręgowych jak i kręgowych. Egzogenne procesy prowadzące do syntezy żółtka polegają na wchłanianiu białkowych prekursorów, powstałych poza jajnikiem, na drodze mikropinocytozy. Proces ten jest uniwersalny u różnych zwierząt. Prekursory/materiał żółtkowy uwalniany jest do płynu jamy ciała i rozprowadzany po organizmie, następnie przenika do jajnika przez błonę podstawną. Ostatecznie dociera do powierzchni oocytu, gdzie zachodzi wchłanianie na drodze endocytozy receptorowej (mikropinocytozy). Materiały zapasowe lub ich prekursory mogą być syntetyzowane w różnych komórkach/narządach takich jak np. trofocyty, celomocyty, komórki folikularne, ciało tłuszczowe, gruczoł trzustkowo – wątrobowy, jelito, system hemalny czy też wątroba

(Thomsen i in. 1980; Kunkel i Nordin 1985 za Rościszewska 2003; Kaulenas 1992 za Rościszewska 2003; Valle 1993; Büning 1994; Szklarzewicz 1994; Siekierska 2003; Telfer 2009; Żelazowska 2005; Telfer 2009; Cardoso i in. 2010; Urbisz i in. 2010; Moosbrugger i in. 2012; Urbisz i Świątek 2013; Jaglarz i in. 2014b).

Materiał żółtkowy powstający wyłącznie na drodze heterosyntezy występuje u niektórych wijów (Myriapoda), niektórych pajęczaków (Arachnida), a także u większości owadów uskrzydłych (Pterygota) oraz u owadów bezskrzydłych (rząd Zygentoma) (Biliński 1979; Postlethwait i Giorgi 1985; Szklarzewicz 1989; Rościszewska 2003).

Gromadzenie materiałów żółtkowych może mieć także charakter mieszany. O mieszanym typie witelogenezy mówi się wówczas, gdy część żółtka jest syntetyzowana przez sam oocyt (autosynteza), a część substancji jest wchłaniana na drodze mikropinocytozy z płynu wypełniającego jamę ciała lub z hemolimfy (heterosynteza). Taki typ witelogenezy obserwowano u pierścienic (Annelida), niektórych owadów (Insecta), wijów (Myriapoda), większości skorupiaków (Crustacea), mięczaków (Mollusca) oraz szkarłupni (Echinodermata) (Biliński 1976, 1979, 1994; Szklarzewicz 1994; Rościszewska 2003). Witelogeneza o mieszanym charakterze występuje także u niesporczaków należących do Parachela w tym np. u *I. g. granulifer*, *D. dispar*, *D. parthenogeneticus*, *P. richtersi*, *T. ruffoi* (Węglarska 1979, 1987; Szymańska 1994; Poprawa 2005a; Poprawa 2006; Rost-Roszkowska i in. 2011; Poprawa i in. 2015b; Janelt 2017), w tym także u analizowanego gatunku *H. exemplaris*. Już na wczesnych etapach oogenezy, gdy komórki zespołu komórkowego (cystocyty) są jeszcze nieodróżnicowane rozpoczyna się gromadzenie materiałów zapasowych na terenie cytoplazmy komórek witelarium. Mimo, że morfologicznie wszystkie komórki zespołu mają tę samą wielkość, kształt oraz charateryzują się taką samą ultrastrukturą, to już na tak wczesnym etapie dochodzi do ukierunkowanego transportu materiałów żółtkowych z przyszłych komórek odżywczych (trofocytów) do przyszłego oocytu (obserwowano materiał zapasowy na terenie cytoplazmy mostków międzykomórkowych). Na etapie środkowej witelogenezy komórki zespołu zaczynają się od siebie różnić na skutek gromadzenia coraz większych ilości żółtka przez sam oocyt oraz transport materiałów żółtkowych z komórek odżywczych (trofocytów) do wzrastającego oocytu. Na tym etapie oogenezy komórki zespołu różnią się od siebie pod względem wielkości oraz ultrastruktury. Jedna z komórek zespołu jest wyraźnie większa posiada więcej cytoplazmy, organelli komórkowych oraz kul materiałów zapasowych niż pozostałe komórki zespołu. Od etapu środkowej witelogenezy można więc już stwierdzić, która komórka różnicuje się w oocyt, a które komórki zespołu pełnią funkcje odżywcze. U

badanego gatunku *H. exemplaris* prekursory żółtka powstają więc na drodze autosyntezy w samym oocyte, a także w wyniku heterosyntezy. Ponieważ gromadzenie żółtka tylko na drodze autosyntezy uważane jest za cechę prymitywną, fakt, że u niesporczaków proces ten zachodzi na drodze heterosyntezy świadczy o ich wysokiej pozycji w rozwoju ewolucyjnym. Poza oocytem materiał żółtkowy u niesporczaków powstaje głównie w trofocytach, ponadto może być także syntetyzowany na terenie komórek nabłonka jelita środkowego (*I. g. granulifer*, *M. polonicus*, *H. exemplaris*) (Rost-Roszkowska i in. 2011, 2013; Hyra i in. 2016a). W syntezę witelogenin mogą być również zaangażowane ciała spichrzowe co ma miejsce u analizowanego *H. exemplaris*, a także u innych gatunków niesporczaków należących do Parachela (*P. richtersi*, *D. dispar*, *I. g. granulifer*, *M. polonicus*) (Węglarska 1979, 1987; Szymańska 1994; Poprawa 2006; Hyra i in. 2016b). Badania histochemiczne wykazały, że na terenie cytoplazmy ciałek spichrzowych *H. exemplaris* w trakcie oogenezy magazyzowane są białka, lipidy oraz polisacharydy. Dodatkowo zaobserwowano zmiany ultrastruktury ciałek spichrzowych zależne od procesu oogenezy świadczące o zaangażowaniu tych komórek w syntezę prekursorów żółtka (Hyra i in. 2016b). Prawdopodobnie u niesporczaków prekursory żółtka syntetyzowane poza jajnikiem uwalniane są do płynu wypełniającego jamę ciała. Następnie przechodzą przez blaszkę podstawną jajnika i są pobierane przez oocyt na drodze mikropinocytozy (endocytozy receptorowej), tak jak ma to miejsce u owadów i innych zwierząt, gdzie prekursory są uwalniane do hemolimfy (Biliński 1979, Büning 1994; Szklarzewicz 1994; Szklarzewicz i in. 2005; Żelazowska 2005; Telfer 2009; Cardoso i in. 2010; Moosburgger i in. 2012). W syntezie żółtka biorą udział cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, aparat Golgiego, wolne rybosomy, a także mitochondria. Charakterystyczne zmiany w ultrastrukturze mitochondriów u *H. exemplaris* mogą świadczyć o udziale mitochondriów w syntezie materiałów zapasowych (synteza lipidów). Organella te ulegają rozdęciu, obserwuje się zanik grzebieni mitochondrialnych, oraz akumulację ziarnisto-włóknistego materiału w matrix mitochondrialnym (Węglarska 1979; Bertolani 1983; Poprawa 2005a; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015c). Udział mitochondriów w syntezie lipidów opisywano już u mięczaków (Mollusca). Co więcej dane literaturowe sugerują, że zmiany zachodzące w matrix mitochondrialnym płazów są związane z syntezą materiałów białkowych, natomiast u pajaka *Plexippus* oraz owada *Gromphadorhina brauneri* sugeruje się udział mitochondriów w powstawaniu lipidów żółtka (Węglarska 1979). Charakterystyczne zmiany w mitochondriach, które sugerują ich udział w syntezie prekursorów materiałów żółtkowych obserwowano w mitochondriach trofocytów *H.*

exemplaris od fazy środkowej witelogenezy. Mitochondria ulegały rozdzieleniu, grzebienie mitochondrialne częściowo zanikały, a w matrix mitochondrialnym pojawiał się kłaczkowaty materiał. Dodatkowo na terenie cytoplazmy oocytów oraz trofocytów od etapu środkowej witelogenezy obserwowano pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie komórkowej. Struktury te przypominają występujące dość powszechnie, pęcherzyki opłaszczone klatryną, uczestniczące w transporcie materiałów żółtkowych (Postlethwait i Giorgi 1985; DiMario i Mahowald 1987 za Sommer i in. 2005; Szklarzewicz 1994; Brooks i Wessel 2004; Telfer 2009; Moosbrugger i in. 2012). Na etapie witelogenezy obserwowano także wakuole jąderkowe na terenie jąder trofocytów oraz oocytów. Dane literaturowe podają, że podobną sytuację obserwowano u gatunku *D. dispar*. Na etapie witelogenezy w jąderkach trofocytów tego niesporczaka pojawiały się wakuole jąderkowe (Poprawa 2005b). Wakuole jąderkowe są strukturami charakterystycznymi raczej dla komórek roślinnych, a u zwierząt obserwuje się je dość rzadko. Ich obecność świadczy o wysokiej aktywności jąderka (związanej m.in. z syntezą RNA) (Lewis 1943; Johnson i Jones 1967; Stępiński 2014). Tym samym obecność tych struktur w jąderkach komórek niesporczaków świadczy o wysokiej aktywności metabolicznej tych komórek, na etapie gromadzenia materiałów zapasowych w cytoplazmie oocytów i trofocytów, w trakcie oogenezy. Wykonane badania histochemiczne wykazały, że na etapie wczesnej witelogenezy na terenie młodego zespołu komórkowego (cystocytów), a w większym stopniu na etapie środkowej i późnej witelogenezy na terenie cytoplazmy oocytów oraz trofocytów *H. exemplaris* gromadzony jest materiał żółtkowy w postaci białek, lipidów i polisacharydów. Gromadzenie takich materiałów zapasowych obserwowano także u pozostałych gatunków niesporczaków u których analizowano proces oogenezy (Bertolani 1983; Poprawa 2005a; Poprawa i in. 2015b, 2015c). Dodatkowo u *H. exemplaris* wykazano także obecność mukopolisacharydów.

Na etapie późnej witelogenezy, gdy rozpoczyna się proces formowania kapsuły jajowej (choriogeneza) tuż pod powierzchnią oolemmy obserwowano gromadzenie się materiału w postaci elektronowo gęstych granul. Charakterystyczna lokalizacja tych struktur w części korowej cytoplazmy oocytów sugeruje, że mogą to być ziarna korowe. Obecność ziaren korowych wykazano u innych zwierząt, w tym u innych gatunków niesporczaków *P. richtersi* (Węglarska 1975; Bertolani 1983); *I. g. granulifer* (Węglarska 1987), *M. polonicus* (Poprawa i in. 2015c), *T. ruffoi* (Janelt 2017). Ziarna korowe pełnią istotną funkcję w trakcie procesu zapłodnienia. W momencie zapłodnienia dochodzi do zainicjowania tzw. reakcji korowej, w wyniku której dochodzi do fuzji ziaren korowych z błoną oocyta. Zawartość ziaren korowych

wylewa się do przestrzeni perioocytarnej, powstaje osłona zapłodnienia, co w konsekwencji zapobiega wniknięciu więcej niż jednego plemnika do oocytu (polispermii). Co ciekawe, struktur tych jak dotąd nie zaobserwowano u owadów (Insecta) (Mazzini i in. 1984).

Choriogeneza u badanego gatunku *H. exemplaris* rozpoczyna się na etapie późnej witelogenezy, gdy wokół oocytów gromadzi się materiał na chorion w postaci małych, kulistych struktur o średniej gęstości elektronowej. Zadaniem kapsuł jajowych jest ochrona zarodka przed szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego jakimi są np. wysychanie, promieniowanie czy urazy mechaniczne, a także ochrona rozwijającego się zarodka i umożliwienie mu wymiany gazowej. Osłony jajowe mogą się składać z różnej liczby warstw, a te mogą mieć mniej lub bardziej skomplikowaną budowę (Mazzini i in. 1984; Rościszewska 1994, 2003; Kumar i in. 2002; Poprawa i in. 2002; Pyka-Foćciak i in. 2003; Kumar i in. 2007; Gaino i in. 2008; Żelazowska 2010). Kapsuły jajowe mogą powstać albo przy udziale samej gamety, może być też tak, że poszczególne warstwy są tworzone przez samą gametę, lub co jest zjawiskiem częstszym, w procesie choriogenezy mogą uczestniczyć rozmaite komórki różnych części układu rozrodczego. Bardzo rzadko synteza prekursorów osłon jajowych ma miejsce poza układem rozrodczym, co obserwuje się np. u ryb (w wątrobie) (Rościszewska 1994; Poprawa 2003). Ze względu na różne sposoby powstawania osłon jajowych wprowadzano różne klasyfikacje dla kapsuł jajowych. Obecnie za najtrafniejszą uważana jest ta zaproponowana przez Ludwiga (1874) i to właśnie według niej w niniejszej pracy będą klasyfikowane osłony jajowe badanego gatunku niesporczaka. Wg Ludwiga (1874) w zależności od tego jakie komórki uczestniczą w syntezie prekursorów na budowę osłony jajowej oraz w jakiej części układu rozrodczego zachodzi ich synteza, wyróżnia się osłony jajowe: pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe. Osłony I - rzędowe powstają przy udziale samego oocytu w jajniku. Podobnie II - rzędowe również powstają w jajniku, jednak w ich syntezie biorą dodatkowo udział komórki folikularne lub też komórki ściany jajnika. Osłony III - rzędowe powstają przy udziale komórek jajowodu bądź dalszych odcinków dróg wyprowadzających układu rozrodczego (Węglarska 1982; Poprawa 2002, 2005b, 2011; Poprawa i in. 2015b, 2015c). W syntezie chorionu niesporczaka *H. exemplaris* bierze udział sam oocyt jak i komórki ściany gonady. Z danych literaturowych wynika, że u zdecydowanej większości niesporczaków chorion jest osłoną mieszaną częściowo I – rzędową, a częściowo II – rzędową powstającą przy udziale oocytu oraz komórek ściany jajnika (Węglarska 1982; Poprawa 2005b, 2011; Poprawa i in. 2015b, 2015c). Jedynym gatunkiem u którego nie zaobserwowano udziału oocytów w tworzeniu chorionu jest *M. polonicus* (Poprawa i in.

2015c). W tym przypadku chorion jest osłoną II – rzędową. Osłona żółtkowa u wszystkich niesporczaków powstaje jako druga, gdy chorion tworzy już ciągłą warstwę na powierzchni oocyta (Węglarska 1982; Poprawa 2005b, 2011; Poprawa, Galus 2007; Poprawa i in. 2015b, 2015c). W jej syntezie uczestniczy tylko oocyt, jest to więc osłona I – rzędowa. Tak więc kapsuły jajowe niesporczaków zbudowane są z dwóch osłon: osłony żółtkowej i chorionu. Osłona żółtkowa przylega do powierzchni oolemy, natomiast chorion jest zlokalizowany zewnątrz. W pełni wykształcony chorion niesporczaków jest trójwarstwowy, wyróżnia się warstwę wewnętrzną przylegającą do osłony żółtkowej, warstwę środkową, która często nazywana jest też warstwą labiryntową z uwagi na charakterystyczny wygląd, oraz warstwę zewnętrzną. Powierzchnia chorionu może być gładka bądź pokryta charakterystycznymi stożkowatymi wyrostkami. Kształt i liczba wyrostków pokrywających powierzchnię chorionu oraz grubość poszczególnych warstw chorionu, a także grubość samej osłony żółtkowej jest różna u różnych gatunków niesporczaków (Węglarska 1982; Bertolani 1983; Bertolani i Rebecchi 1993, 1996; Poprawa 2005b, 2011; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015b, 2015c, 2015d).

Niesporczaki składają jaja wolno do środowiska lub też jak ma to miejsce u analizowanego gatunku do wylinki. Zwykle jaja składane do wylinki mają gładką powierzchnię chorionu, co potwierdza się także dla *H. exemplaris*. Nie jest to jednak regułą, gdyż znane są przypadki, takie jak *Hypsibius roanensis* i *Hypsibius scabropygus*, których osobniki składają do wylinki jaja posiadające ornamentowane kapsuły z małymi wypukłościami (Nelson i in. 2010). Inne gatunki składające jaja o gładkim chorionie to np. *T. ruffoi* (obserwacje własne), *M. tardigradum* (obserwacje własne) oraz *I. g. granulifer* (Poprawa 2011). Gatunki składające jaja bezpośrednio do środowiska posiadają jaja o charakterystycznie urzeźbionej powierzchni. Takie jaja składają np. niesporczaki z rodzajów *Dactylobiotus*, *Paramacrobiotus*, *Murrayon*, *Minibiotus*, *Bartolanius*, *Eohypsibius*, *Ramazzottius*, *Hebesuncus* oraz *Fractonotus*, należące do Eutardigrada, natomiast wśród Heterotardigrada *Oreella* (Grigarić i in. 1973; Węglarska 1982; Kinchin 1994; Poprawa 2003, 2005a; Nelson i in. 2010; obserwacje własne). Jaja o urzeźbionym chorionie charakteryzuje ogromna różnorodność (Bertolani 1983; Kinchin 1994; Poprawa, Galus 2007; Nelson i in. 2015; Poprawa i in. 2015d). Chorion urzeźbiony posiada wyrostki - ich liczba, wzajemna odległość od siebie, wysokość, kształt (mogą być zakończone rozetką, haczykiem, ich szczyt może być zaokrąglony lub też spłaszczony) stanowią bardzo ważne cechy taksonomiczne. Chorion podstawowy – czyli chorion występujący pomiędzy wyrostkami stożkowymi może

być gładki, pokryty drobną siateczką lub może tworzyć charakterystyczne „areolacje” występujące np. u *M. richtersi* – regularnie ułożone zagłębienia tworzące charakterystyczne, duże oczka układające się w regularną sieć (Węglarska 1975; Dastych 1980, 1988; Węglarska 1982; Kinchin 1994; Poprawa 2005b; obserwacje własne). Kapsuły jajowe wielu zwierząt (zarówno kręgowców jak i bezkręgowców) wykazują pewne charakterystyczne cechy morfologiczne takie jak np. ukształtowanie powierzchni, obecność i lokalizacja wyspecjalizowanych struktur jak np. haczyki, dyski czepne, wyrostki oddechowe, a także obecność wyspecjalizowanych regionów takich jak mikropyle, aeropyle, hydropyle czy linia wylęgu. Co ciekawe u niesporczaków nie zaobserwowano w budowie osłon jajowych takich struktur jak mikropyle, hydropyle, aeropyle, wieczko, czy linia wylęgu, które są na przykład obecne w kapsułach jajowych owadów (Margaritis 1985; Biliński i Jankowska 1987; Ogorzałek 1987; Rościszewska 1991a, 1991b, 1994, 1996; Kambyseis 1993; Rościszewska 1994, 2003; Simiczyjew 1994; Zawadzka i in. 1997; Ząbczyk 1999; Poprawa i in. 2002; Buckner i in. 2002; Pyka-Fościak i in. 2003; Kumar i in. 2007). Podobna sytuacja, czyli brak wyspecjalizowanych regionów na powierzchni kapsuły jajowej opisano u skrytoszczekich (Entoghantha) (Biliński 1993).

U większości zwierząt kolejność formowania osłon jajowych przedstawia się następująco: najpierw powstaje osłona żółtkowa, a następnie chorion (Poprawa i in. 2002). Podobnie sytuacja przedstawia się u owadów (Insecta), czy u pazurnic (Onychophora) - siostrzanej grupy dla Tardigrada. U owadów osłona żółtkowa powstaje przy udziale oocyty bądź oocyty i komórek folikularnych, a po jej wykształceniu powstaje chorion, którego prekursorzy są syntezowane przez komórki folikularne (Büning 2006; Telfer 2009; Jaglarz i in. 2010; Özyurt i in. 2013). U pazurnic najpierw dzięki syntezie samego oocyty powstaje osłona żółtkowa, następnie jako drugi powstaje chorion przy udziale oocyty oraz komórek macicy (Norman i Tait 2008). Co ciekawe u analizowanego gatunku *H. exemplaris*, podobnie jak u wszystkich pozostałych niesporczaków, u których badano proces oogenezy jako pierwszy powstaje chorion, a dopiero później następuje synteza osłony żółtkowej (Węglarska 1982; Poprawa 2005b, 2011; Poprawa i Galus 2007; Poprawa i in. 2015b, 2015c). Podobną sytuację opisano dla *Tetrodontophora bielanensis* (Collembola) (Krzysztofowicz i Kisiel 1989 za Poprawa 2003). Synteza osłony żółtkowej u tego gatunku następuje dopiero po złożeniu jaj. Jest to cecha będąca przystosowaniem tego gatunku do zapłodnienia, które ma miejsce w jajniku. To sugeruje, że być może u niesporczaków synteza osłony żółtkowej jako drugiej również jest cechą przystosowawczą. Na korzyść tej tezy przemawia również fakt, że kapsuły

jajowe niesporczaków nie posiadają otworów mikropylarnych, a chorion nie powstaje od razu jako warstwa ciągła, lecz tworzą się najpierw wysepki chorionu, które następnie zlewają się ze sobą. Co więcej u analizowanego gatunku *H. exemplaris* zaobserwowano struktury przypominające ziarna korowe chroniące przed polispermia. Wszystko to sugeruje, że być może *H. exemplaris* był gatunkiem rozdzielnopłciowym, a partenogenetyczny sposób rozmnażania jest cechą wtórną, która pojawiła się u tego gatunku jako przystosowanie tego gatunku do warunków środowiska.

Niesporczaki wykazują zdolność do zrzucania kutikuli, będącej wytworem komórek nabłonkowych ściany ciała. Tardigrada należą więc do kladu wylinkowców (Telford i in. 2008). Kutikula niesporczaków może przybierać różne formy, może być gładka, posiadać guzki lub też składać się z zachodzących na siebie płytek. Generalnie posiada trójwarstwową budowę, wyróżnia się epikutikulę, intrakutikulę oraz prokutikulę. Wygląd zewnętrzny kutikuli oraz jej wyrostki pełnią bardzo istotną funkcję w taksonomii pozwalając na identyfikację Heterotardigrada i Eutardigrada (Nelson i in 2010). W trakcie procesu linienia dochodzi także do oddzielenia kutikuli wyścielającej jelito przednie i tylne, stąd u osobników przygotowujących się do owipozycji obserwuje się zanik aparatu bukalnego, będącego częścią jelita przedniego, tym samym osobniki na czas linienia nie są zdolne do pobierania pokarmu (Nelson i in. 2010; Nelson i in. 2015; obserwacje własne). U badanego gatunku *H. exemplaris*, podobnie jak u innych niesporczaków późna witelogeneza oraz składanie jaj jest powiązane z linieniem (Bertolani 1983; Graven 1984; Dewel i in. 1993). Wiele gatunków niesporczaków, podobnie jak gatunek analizowany w niniejszej pracy, wykorzystuje wylinkę do składania jaj (Bertolani 1983; Poprawa 2005b). Także u *H. exemplaris* proces linienia jest skorelowany z procesem oogenezy. Wraz z końcem procesu oogenezy osobniki badanego gatunku posiadają podwójną warstwę kutikuli, z czego starsza warstwa zostaje zrzucana w procesie linienia i wykorzystana do zdeponowania jaj w procesie owipozycji.

W jamie ciała niesporczaków obecne są ciała spichrzowe (Kinchin 1994; Poprawa 2006; Nelson i in 2010; Kaczmarek 2013; Nelson i in. 2015). Wielkość, liczba oraz ultrastruktura ciałek spichrzowych zależy od stanu odżywienia zwierzęcia oraz jego kondycji (Węglarska 1975; Dewel i in. 1993). Główną funkcją, tych swobodnie pływających w płynie jamy ciała niesporczaków komórek, jest magazynowanie materiałów zapasowych. Wykazano, że na terenie cytoplazmy ciałek spichrzowych niesporczaków zachodzi akumulacja białek, lipidów oraz polisacharydów (Rosati 1968; Węglarska 1975; Szymańska 1994; Jönsson i Rebecchi 2002; Poprawa 2006; Hyra i in. 2016b). Zgromadzone rezerwy pokarmowe mogą

zostać wykorzystane przez zwierzę, gdy pogarszają się warunki środowiska lub gdy nie jest w stanie przyjmować pokarmu, czyli także w stanie kryptobiozy (Węglarska 1975; Jönsson i Rebecchi 2002; Reuner i in. 2010; Czernakova i in. 2018). Dodatkowo materiały zapasowe ciałek spichrzowych mogą również zostać wykorzystane w trakcie procesu oogenezy jako prekursorzy witelogenin (Szymańska 1994; Poprawa 2006; Hyra i in. 2016b). Volkman i Greven (1993) wykazali aktywność tyrozynazy w cytoplazmie ciałek spichrzowych niesporczaków. Tyrozynaza jest także aktywna w hemocytach, które występują u owadów (Insecta), które to pełnią ważną rolę w odporności immunologicznej (Lavine i Strand 2002; Marmaras i Lampropoulou 2009). Wydaje się więc, że ciała spichrzowe u niesporczaków pełnią podobną funkcję jak hemocyty u owadów i stąd podejrzewa się je również o pełnienie funkcji obronnych (Kinchin 1994). Większość danych literaturowych związanych z ciałkami spichrzowymi dotyczy ich morfologii i fizjologii (Richters 1911; Rahm 1925; Marcus 1929; May 1948; Węglarska 1957, 1975; Rosati 1968; Kinchin 1993, 1994; Volkman i Greven 1993; Jönsson i Rebecchi 2002; Reuner i in. 2010). Jak dotąd istnieje kilka doniesień dotyczących zmian ultrastruktury ciałek spichrzowych skorelowanych z procesem oogenezy u niesporczaków (Szymańska 1994; Poprawa 2006; Hyra i in. 2016b). U analizowanego gatunku *H. exemplaris* zwrócono uwagę na ultrastrukturę ciałek spichrzowych w trakcie procesu oogenezy. Z obserwacji wynika, że zmiany w ultrastrukturze tych komórek są skorelowane z procesem oogenezy. Wraz z postępującymi zmianami w jajniku związanymi z procesem oogenezy, na terenie cytoplazmy ciałek spichrzowych obserwowano akumulację białek, cukrów i lipidów w postaci kul materiałów o różnej gęstości elektronowej. Na etapie zaawansowanej choriogenezy, gdy oocyty charakteryzują się znaczną wielkością i uciskają jelito, dochodzi do zmniejszania się ilości zmagazynowanych kul materiałów zapasowych na terenie ciałek spichrzowych. Podobne zmiany obserwowano także u innych gatunków niesporczaków: *P. richtersi* (Szymańska 1994), *D. dispar* (Poprawa 2006), *I. g. granulifer* oraz *M. polonicus* (Hyra i in. 2016b). U analizowanego gatunku jąderka ciałek spichrzowych miały charakter heterogeny co przemawia za ich wzmożoną aktywnością (Węglarska 1979), a dodatkowo w jąderkach ciałek spichrzowych obserwowano także wakuole jąderkowe, których obecność świadczy o wysokiej aktywności jąderek (Lewis 1943; Johnson i Jones 1967; Stępiński 2014). Wszystko to pozwala przypuszczać, że ciała spichrzowe to komórki o wysokim stopniu aktywności metabolicznej, które mogą aktywnie uczestniczyć w procesie witelogenezy w trakcie oogenezy. Co więcej stanowią rezerwuar energetyczny na czas, gdy niesporczak nie jest w stanie pobierać pokarmu, z uwagi na ogromne oocyty, które uciskają

światło jelita środkowego zwłaszcza w stadium simplex kiedy to dochodzi do usunięcia zesklerotyzowanych elementów aparatu bukalnego. Pod tym względem ciała spichrzowe niesporczaków wydają się przypominać swoją funkcją ciała tłuszczowe obecne u owadów (Insecta). Magazynują materiały zapasowe oraz uczestniczą w syntezie witelogenin, które następnie są transportowane do jajnika (Atella i in. 2005; Arrese i Soulages 2010). Transport witelogenin z ciałek spichrzowych do jajnika prawdopodobnie zachodzi na drodze dyfuzji i/lub transportu pęcherzykowego (endocytoza receptorowa; mikropinocytoza) (Węglarska 1987; Poprawa 2005b).

7. WNIOSKI

Przedstawione powyżej badania dotyczące procesu oogenezy niesporczaka *Hypsibius exemplaris* pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

1. Analizowany gatunek *Hypsibius exemplaris* z powodzeniem daje się hodować w warunkach laboratoryjnych przy zachowaniu odpowiednich parametrów. W warunkach laboratoryjnych rozmnaża się partenogenetycznie.
2. Układ rozrodczy zbudowany jest z nieparzystego jajnika oraz nieparzystego jajowodu otwierającego się do kloaki.
3. Ścianę jajnika stanowi pojedyncza warstwa, płaskich komórek pochodzenia somatycznego, wspartych na blaszce podstawnej, a częścią apikalną zwróconych jest do wnętrza jajnika. Komórki ściany jajnika pod względem pełnionej funkcji są odpowiednikami komórek folikularnych stawonogów.
4. Oogeneza zlokalizowana (gonadalna) jest typu meroistycznego (rozwój oocytów jest wspomagany przez ich komórki siostrzane – trofocyty, komórki tworzą zespół).
5. W obrębie jajnika występują strefy: szczytowo zlokalizowane germarium oraz witelarium zajmujące większą część jajnika.
6. Zespoły komórek płciowych są rozgałęzione, a wszystkie komórki w zespole są jednojądrowe.
7. Komórki zespołu komórek płciowych połączone są ze sobą stabilnymi mostkami międzykomórkowymi posiadającymi dwie okładziny: elektronowo gęstą okładzinę zewnętrzną i okładzinę wewnętrzną o mniejszej gęstości elektronowej.
8. W każdym zespole komórek płciowych tylko jedna komórka różnicuje się w oocyt, podczas gdy pozostałe komórki pełnią funkcję komórek odżywczych (trofocyty).
9. W jajniku znajduje się pula komórek (oogoniów), które zachowują zdolność do podziałów komórkowych, dzięki czemu proces oogenezy zachodzi przez całe życie u badanego gatunku.
10. Witelogeneza ma charakter mieszany. Prekursory żółtka częściowo powstają na drodze syntezy własnej oocytu (autosynteza), a częściowo są syntetyzowane poza oocytem i transportowane do ooplazmy przez mostki cytoplazmatyczne (z trofocytów) lub na drodze endocytozy receptorowej (z ciałek spichrzowych i komórek nabłonka jelita środkowego). Choriogeneza rozpoczyna się na etapie późnej witelogenezy.

11. Po zakończeniu witelogenezy, po zamknięciu mostków międzykomórkowych trofocyty podlegają śmierci komórkowej na drodze apoptozy.
12. Zgodnie z klasyfikacją osłon jajowych wg Ludwiga (1874), chorion jest osłoną mieszaną częściowo I - rzędową, a częściowo II - rzędową, natomiast osłona żółtkowa jest osłoną I - rzędową.
13. Kapsuła jajowa zbudowana jest z dwóch osłon jajowych: (1) osłony żółtkowej i (2) trójwarstwowego chorionu. Chorion powstaje jako pierwszy, a osłona żółtkowa jako druga.
14. Jaja o gładkim (pozbawionym stożkowatych wyrostków) chorionie składane są do wylinki.
15. Proces owipozycji związany jest z procesem linienia.

8. STRESZCZENIE

Niesporczaki to słabo poznana grupa mikroskopijnych Ecdysozoa. Wraz z pazurnicami (Onychophora) i stawonogami (Arthropoda) należą do monofiletycznej grupy Panarthropoda. Do niedawna niesporczaki nie miały większego praktycznego bądź ekonomicznego znaczenia. Dzięki stabilizacji błon lipidowych oraz kwasów nukleinowych są zdolne przetrwać zamrażanie, ekstremalne odwodnienie, wystawienie na działanie próżni czy promieniowanie jonizujące. Lepsze poznanie biologii oraz budowy niesporczaków ma znaczenie nie tylko dla tardigradologów, zoologów czy biologów ewolucyjnych, ale także znajduje wykorzystanie w innych odległych dziedzinach nauki takich jak medycyna, farmakologia, przemysł spożywczy i farmaceutyczny, a także astrobiologia. Badany w niniejszej pracy gatunek *Hypsibius exemplaris* został uznany w roku 2007 jako nowy organizm modelowy. Materiał analizowano przy użyciu mikroskopii świetlnej, elektronowej mikroskopii skaningowej i transmisyjnej, mikroskopii konfokalnej oraz nowej metody seryjnego skanowania powierzchni bloczka (SBEM). *H. exemplaris* należący do gromady Eutardigrada, rzędu Parachela, posiada pojedynczy, workowaty jajnik zlokalizowany nad jelitem. Jajnik w części szczytowej jest przytwierdzony do ściany ciała dwiema niciami filamentu terminalnego. Ścianę jajnika buduje jednowarstwowy nabłonek wsparty na blaszce podstawnej, komórki nabłonka swą częścią apikalną skierowane są do wnętrza gonady. W obrębie jajnika wyróżnia się dwie strefy: mniejszą zlokalizowaną szczytowo - germarium, oraz większą witelarium. U analizowanego gatunku w jajniku obecne są tylko komórki linii płciowej: oogonia, oocyty oraz trofocyty. W witelarium obecne są zespoły komórek płciowych typu rozgałęzionego, powstałe w wyniku niepełnych cytokinez. W trakcie oogenezy w obrębie jednego zespołu tylko jedna komórka różnicuje się w oocyt, natomiast pozostałe komórki pełnią funkcję odżywczą (trofocyty), wspomagając rozwój oocytu. U badanego gatunku *H. exemplaris* witelogeneza ma charakter mieszany. Prekursory żółtka powstają na drodze autosyntezy w samym oocycie, a także w wyniku heterosyntezy - syntetyzowane w trofocytach, na terenie ciałek spichrzowych i komórek jelita środkowego. Przed owipozycją następuje zamknięcie mostków cytoplazmatycznych łączących oocyt z trofocytami i śmierć komórek odżywczych na drodze apoptozy. Choriogeneza rozpoczyna się na etapie późnej witelogenezy. Chorion powstaje jako pierwszy na skutek syntezy samego oocytu oraz komórek ściany jajnika, natomiast osłona żółtkowa powstaje jako druga tylko przy udziale oocytu. Zgodnie z klasyfikacją osłon jajowych wg Ludwiga (1874), chorion jest

osłoną mieszaną, częściowo I – rzędową, a częściowo II - rzędową, natomiast osłona żółtkowa jest osłoną I – rzędową. W pełni wykształcona kapsuła jajowa *H. exemplaris* jest zbudowana z cienkiej osłony żółtkowej przylegającej do oolemy oraz trójwarstwowego chorionu. Proces owipozycji badanego gatunku wiąże się z linieniem. Samica zrzuca starą kutikulę do której składane są jaja. W trakcie linienia następuje także wymiana kutikuli wyściełającej jelito tylne oraz elementów zesklerotyzowanych aparatu bukalnego. Złożone jaja posiadają chorion o gładkiej powierzchni, pozbawiony stożkowych wyrostków.

9. SUMMARY

Tardigrades are poorly known group of microscopic Ecdysozoa. Together with Onychophora and Arthropoda, tardigrades belong to monophyletic group called Panarthropoda. Up till now tardigrades do not play any important role in practical or economical meaning. However, this small animals attract more and more scientist due to their special abilities. Thanks to stabilization of lipid membranes and nucleic acids they are able to withstand freezing, extreme dehydration, exposure on vacuum or ionizing radiation. Better understanding of their biology and how they are built is essential not only for tardigradologists, zoologists or evolutionary biologist, but also for their potential applications for instance medicine, pharmacology, food industry, pharmaceutical industry or even astrobiology. Our knowledge about the mechanisms of tardigrade anabiosis has led scientists to the development of dry vaccines that are used widely in Third World countries.

Species *Hypsibius exemplaris*, examined in this PhD thesis, has been recognized in 2007 as a new model organism. The material was analyzed by using different methods such as a light microscope, scanning electron microscope, transmission electron microscope, confocal microscope as well as a new method called SBEM – a serial block face scanning electron microscope. *H. exemplaris* belongs to class Eutardigrada, order Parachela. It possesses a single, sac-like ovary, located above a midgut. The top part of the ovary is attached to a body wall by two ligaments of terminal filament. The wall of the ovary consists of flat epithelial cells supported on non-basal lamina. The apical part of these cells is localized to the ovary interior. There can be distinguished two zones in the ovary: the smaller one, situated in the top part of the ovary called germarium, and the second - bigger one called vitellarium. In the ovary of *H. exemplaris* there are only germ line cells such as: oogonias, oocytes and trophocytes. In vitellarium cells create a germ cell clusters branched type, thanks to incomplete cytokinesis. During oogenesis process only one cell of germ cell cluster develop into oocyte while the rest cells support oocyte development as a trophocytes. In *H. exemplaris* occur a mixed vitellogenesis. Yolk precursors occur thanks to authosynthesis in oocyte as well as thanks to heterosynthesis - synthesized in trophocytes, storage cells and in epithelial cells of midgut. Just before oviposition cell bridges which connect oocytes with trophocytes became closed, then a cell death of trophocytes occur thanks apoptosis. Choriogenesis begins during the late vitellogenesis. As first envelope is deposited chorion due to oocyte and ovary wall activity, then vitelline envelope is synthesized thanks to oocyte activity. According to

egg envelope classification established by Ludwig (1874) chorion is a mixed type - primary (secreted by the oocyte) and secondary (secreted by the cells of ovary wall) while vitelline envelope is a primary type . A complete egg capsule of *H. exemplaris* is built of thin vitelline envelope adhering to oolemma and three-layer chorion. Oviposition of investigated species is connected with moulting. A female shed an old cuticule and laid eggs inside it. During moulting tardigrade get rid of cuticule covered body outside as well as cuticule covered foregut and hindgut. *H. exemplaris* eggs are covered with smooth chorion, it doesn't have any conical processes distinctive for tardigrade ornamented eggs.

10. LITERATURA

1. Adiyodi R., Subramoniam T. 1983. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) Reproductive biology of invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption. Chichester, John Wiley & Sons Ltd; 443 - 495.
2. Aguinaldo A., Turbeville J., Linford L., Rivera M., Garey J., Raff R., Lake J. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods, and other moulting animals. *Nature*, 387: 489 - 493.
3. Aizenshtat T. 1988. Oocyte growth and vitellogenesis. In: Oocyte Growth and Maturation. Ed by Dettlaff TA, Vassetzky SG, Plenum Pub Co, New York, 1 - 75.
4. Alexandrova O., Schade M., Böttger A., David C. 2005. Oogenesis in Hydra: nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Developmental Biology*, 281(1): 91 - 101.
5. Ammermann D. 1967. Die Cytologie der Parthenogenese bei dem Tardigraden *Hypsibius dujardini*. *Chromosoma*, 23(2), 20 - 213.
6. Ando H., Makioka T. 1999. Structure of the ovary and mode of oogenesis in freshwater crab *Potamon dehaani*. *Journal of Morphology*, 239(1): 107 - 114.
7. Anan'ina T., Vedernikov A., Khodzhanov A., Stegniĭ V. 2010. Development of ovarioles and nurse cells cytoskeleton in *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera; Calliphoridae). *Tsitologiya*, 52(2): 110 - 6.
8. Arakawa K., Yoshida Y., Tomita M. 2016. Genome sequencing of a single tardigrade *Hypsibius dujardini* individual. *Scientific Data*, 3: 160063.
9. Arrese E., Soulages J. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207 - 225.
10. Atella G., Gondim K., Machado E., Medeiros M., Silva-Neto M., Masuda H. 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3): 405 - 430.
11. Avdonina A., Biserova N., Bertolani R., Rebecchi L. 2007. Ultrastructure of the digestive system of *Ramazzottius tribulosus* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada) in relationship with diet. *Journal of Limnology*, 66(1): 5 - 11.
12. Baccetti B. 1987. The evolution of sperm cell in the phylum Tardigrada (electron microscopy of tardigrades). In: Bertolani R. (ed.) *Biology of Tardigrades. Selected Symposia and Monographs U. Z. I. Modena: Mucchi*, 87 - 91.

13. Baccetti B., Rosati F., Selmi G. 1971. Electron microscopy of tardigrades. 4. The spermatozoon. *Monitore zoologico italiano*, 5: 231 - 240.
14. Bakke T. 1983. Pogonophora. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
15. Baluška F., Volkmann D., Barlow P. 2006. Cell-cell Channels and their implications for Cell Theory. In: Baluška F., Volkmann D and Barlow P. (eds) *Cell – Cell Channels*. New York: Landes Bioscience, Georgetown TX/Springer Science, 1 - 18.
16. Baumann H. 1961. Der Lebensablauf von *Hypsibius* (H.) *convergens* Urbanowicz (Tardigrada). *Zoologischer Anzeiger*, 167: 9 - 12.
17. Baumann H. 1964. Über den Lebenslauf und die Lebensweise von *Milnesium tardigradum* Doyère (Tardigrada). *Veroff. UberseeMus. Bremen* 3: 161 - 171.
18. Beams H. & Kessel R. 1983. Cnidaria. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
19. Beltrán-Pardo E., Jönsson I., Wojcik A., Haghdoust S., Harms-Ringdahl M., Bermúdez-Cruz R.M., Bernal Villegas, J.E. 2013. Sequence analysis of the DNA-repair gene rad51 in the tardigrades *Milnesium cf. tardigradum*, *Hypsibius dujardini* and *Macrobiotus cf. harmsworthi*. *Journal of Limnology*, 72(S1), 80 - 91.
20. Bemm F., Weiß C., Schultz J., Förster F. 2016. Genome of a tardigrade: Horizontal gene transfer or bacterial contamination? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), E3054 - E3056.
21. Bertolani R. 1975. Cytology and Systematics in Tardigrada. *Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco De Marchi*, 32: 17 - 35.
22. Bertolani R. 1976. Osservazioni cariologiche su *Isohypsibius augusti* (Murray, 1907) e *I. Megalonyx* Thulin, 1928 (Tardigrada) e ridescrizione delle due specie. *Bollettino di Zoologia Italiana*, 43: 221 - 234.
23. Bertolani R. 1979. Hermaphroditism in tardigrades. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 1: 67 - 71.
24. Bertolani R. 1982. Cytology and reproductive mechanisms in Tardigrades. East Tennessee State University Press, Johnson City, Tennessee, 93 - 114.

25. Bertolani R. 1983. Tardigrada. In: Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (eds.) Reproductive Biology of Invertebrates. Volume II. Spermatogenesis and Sperm Function. Chister, John Wilry & Sons Ltd.
26. Bertolani R. 1987. Sexuality, reproduction and propagation in tardigrades, in: Bertolani R., Ed. Biology of tardigrades, Selected Symposia and Monographs U. Z. I., 1. Mucchi, Modena, Italy.
27. Bertolani R., Manicardi G. 1986. New cases of hermaphroditism in tardigrades. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development, 9: 363 – 366.
28. Bertolani R. & Rebecchi L. 1993. A revision of the *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada: Macrobiotidae), with some observations on the taxonomic characters of eutardigrades. Zoologica Scripta, 22: 127 - 152.
29. Bertolani R. & Rebecchi L. 1996. Phylogenetic significance of egg shell variation in tardigrades. Zoologica Scripta, 22: 127 - 152.
30. Bertolani R., Guidetti R., Jönsson K., Altiero T., Boschini D., Rebecchi L. 2004. Experiences on dormancy in tardigrades. Journal of Limnology, 63(1s): 16 - 25.
31. Bielecki A., Świątek P., Cichocka J., Siddall M., Urbisz A., Płachno B. 2014. Diversity of features of the female reproductive system and other morphological characters in leeches (Cetellata, Hirudinida) in phylogenetic conception. Cladistics, 30(5): 540 - 554.
32. Binda M., Kristensen R. 1986. Notes on the Genus *Oreella* (Oreellidae) and the Systematic Position of *Carphania fluviatilis* Binda, 1978 (Carphanidae fam. nov., Heterotardigrada). Animalia, 13(1/3): 9 - 20.
33. Biliński Sz. 1976. Ultrastructural studies on the vitellogenesis of *Tetradontophora bielensis* (Wega) (Collembola). Cell and Tissue Research, 168: 399 - 410.
34. Biliński Sz. 1977. Oogenesis in *Acerentomon gallicum* Jonescu (Protura). Previtellogenic and Vitellogenic Stages. Cell and Tissue Research, 179: 401 - 412.
35. Biliński Sz. 1979. Powstawanie żółtka w oogenezie bezkręgowców. Postępy Biologii Komórki, 6(4): 249 - 266.
36. Biliński Sz. 1993. Structure of ovaries and oogenesis in Entognathans (Apterygota). International Journal of Insect Morphology and Embryology, 22(2 - 4): 255 - 269.
37. Biliński Sz. 1994. The ovary of Entognatha. In: Büning J. (ed). The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. Chapman & Hall, London, 7 - 30.

38. Biliński Sz. 1998. Ovaries, oogenesis and insect phylogeny. Introductory remarks. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 36(4): 143 - 145.
39. Biliński Sz. 2005. Oogeneaz. W *Podstawy embriologii zwierząt i człowieka* tom 1 (red. Jura Cz., Klag J.), Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 38 - 60.
40. Biliński Sz., Jaglarz M., Tworzydło W. 2017. The Pole (Germ) Plasm in Insect Oocytes. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 63: 103 - 126.
41. Biliński Sz., Jankowska W. 1987. Oogenesis in the bird louse *Eomenacanthanthus stramineus* (Insecta, Mallophaga). I. General description and structure of the egg capsule. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie*, 116: 1 - 12.
42. Biliński Sz., Klag J. 1977. The oogenesis in *Acerentomon gallicum* Jonescu (Protura). An ultrastructural analysis of chorion formation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Zoologia*, 20: 101 – 106.
43. Biliński Sz., Klag J. 1994. Budowa jajników i zarys przebiegu oogenezy owadów. W Biliński Sz., Bielańska – Osuchowska Z., Kawiak J. (eds). *Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6 Oogeneza*, PWN, Warszawa.
44. Biliński Sz., Szklarzewicz T. 1992. The ovary of *Catajapyx aquilonaris* (Insecta, Enthognatha); ultrastructure of germarium and terminal filament. *Zoomorphology*, 112: 247 - 251.
45. Boothby T., Tenlen, J., Smith F, Wang J., Patanella K., Nishimura E, Tintori S., Li Q., Jones C., Yandell M., Messina D., Glasscock J. & Goldstein B. 2015. Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 15976 - 15981.
46. Borner J., Rehm P., Schill R.O., Ebersberger I., Burmester T. 2014. A transcriptome approach to ecdysozoan phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 80: 79 - 87.
47. Brooks J., Wessel G. 2004. The major yolk protein of sea Urchins is endocytosed by a dynamin-dependent mechanism. *Biology of Reproduction*, 71: 705 - 713.
48. Buckner J., Freeman T., Ruud R. Chu C., Henneberry T. 2002. Characterization and functions of the whitefly egg pedicel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49: 22 - 33.

49. Büning J. 1994. The ovary of Ectognatha, the insects s. str. (In: The Insect Ovary: Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution. Büning J. ed. Chapman & Hall, London), 31 - 400.
50. Büning J. 2006. Ovariole Structure Supports Sistergroup Relationship of Neuropterida and Coleoptera. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 64(2): 115 - 126.
51. Campbell L., Rota-Stabelli O., Edgecombe G., Marchioroc T., Longhorna S., Telford M., Philippe H., Rebecchi L., Peterson K., Pisani D. 2011. MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38): 15920- 15924.
52. Cardoso A., Cres R., Moura A., De Almeida F., Bijovsky A. 2010. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(3): 254 - 262.
53. Cooley L., Verheyen E., Ayers K. 1992. chickadee encodes a profiling required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69(1): 173 - 84.
54. Crompton D., Whitfield P. 1974. Observations on the functional organization of the ovarian balls of *Moniliformis* and *Polymorphus* (Acanthocephala). *Parasitology*, 69 (3): 429 - 43.
55. Crowe J. 1975. The physiology of cryptobiosis in Tardigrades. *Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco De Marchi*, 32: 37 - 59.
56. de Cuevas M., Lilly M., Spradling A. 1997. Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 31: 405 - 428.
57. Czernekova M., Janelt K., Student S., Jönsson I., Poprawa I. 2018. A comparative ultrastructure study of storage cells in the eutardigrade *Richtersius coronifer* in the hydrated state and after desiccation and heating stress. *PLoS ONE* 13(8): e0201430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201430>.
58. Dastyh H. 1972. *Isohypsibius weglarskae* sp. n. a New Species of Tardigrada from Poland. *Bulletin de l'Académie Polonaise Des Sciences, Série des sciences biologiques Cl. II. Vol. XX, No. 11*, 761 – 764.
59. Dastyh H. 1973. Systematic studies on Tardigrada. I. Systematic position of some species. *Bulletin de la Société des Amis des Sciences et des Letteres de Poznan. Serie D. 14*: 77 - 87.

60. Dastych H. 1975. Some Tardigrada from Himalayas (Nepal) with a description of *Echiniscus (E.) nepalensis* n. sp. *Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia* Dott. Marco De Marchi, Pallanza, 32: 61 - 68.
61. Dastych H. 1980. Niesporczaki (Tardigrada) Tatrzańskiego Parku Narodowego. *Monografia Fauny Polski*, Warszawa – Kraków, 9: 1 - 232.
62. Dastych H. 1988. The Tardigrada of Poland. *Monografia Fauny Polski*, Warszawa – Kraków, 16: 1 - 287.
63. Degma P., Bertolani R., Guidetti R. 2009 - 2018. Actual checklist of Tardigrada species. 34th Edition: 30-06-2018. www.tardigrada.modena.unimo.it.
64. Deng W., Lin H. 1997. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 189(1): 79 - 94.
65. de Pomerai D. 1990. *From Gene to Animal*. Cambridge University Press, Cambridge.
66. Dewel R., Dewel W. 1997. The place of tardigrades in arthropod evolution. In: Fortey RA, Thomas RH (eds) *Arthropod Relationships*. Chapman and Hall, London, 109 - 123.
67. Dewel R., Nelson D., Dewel W. 1993. Tardigrada. In: Harrison FW, Rice ME (eds) *Microscopic anatomy of invertebrates*. Volume 12. Onychophora Chilopoda and Lesser Protostomata. Wiley - Liss, Inc, 143 - 183.
68. DiMario P., Mahowald A. 1987. Female sterile (1) yolkless: a recessive female sterile mutation in *Drosophila melanogaster* with depressed numbers of coated pits and coated vesicles within the developing oocytes. *Journal of Cell Biology*, 105(1): 199 - 206.
69. Doyère L. 1840. Mémoire sur les Tardigrades. *Annales des sciences naturelles* 14:269 - 361.
70. Dunn C., Giribet G., Edgecombe G., Hejnol A. 2014. Animal Phylogeny and Its Evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45: 371 - 395.
71. Dunn C., Hejnol A., Matus D., Pang K., Browne W., Smith S., Seaver E., Rouse G., Obst M., Edgecombe G., Sørensen M., Haddock S., Schmidt-Rhaesa A., Okusu A., Kristensen R., Wheeler W., Martindale M., Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452: 745 - 749.

72. Dykstra M. 1992. Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting. Plenum Press, New York & London, 171.
73. Eckelbarger K., Larson R. 1992. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish *Linuche unguiculata* and *Stomolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa. Marine Biology, 114(4): 633 - 643.
74. Ellis R. 2010. The sperm/oocyte decision, a *C. elegans* perspective. In (eds.) Verlhac M., Villeneuve A. Oogenesis: The Universal Process. John Wiley & Sons Ltd, 3 - 26.
75. Erdmann W., Idzikowski B., Kowalski W., Szymański B., Kosicki J., Kaczmarek Ł. 2017. Can the tardigrade *Hypsibius dujardini* survive in the absence of the geomagnetic field? PLoS ONE, 12 (9), e0183380.
76. Erwin H., Donald J. 1994. Oogenesis in a placental viviparous onychophoran. Tissue and Cell, 26(6): 867 - 889.
77. Fell P. 1983. Porifera. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
78. Fernández J., Tellez V., Olea N. 1992. Hirudinea. In: Harrison FW, Gardiner SL (eds) Microscopic anatomy of invertebrates, vol 7. Annelida. Wiley - Liss, New York, 323 - 394.
79. Fernandez C., Vasanthan T., Kissoon N., Karam G., Duquette N., Seymour C., Stone J. 2016. Radiation tolerance and bystander effects in the eutardigrade species *Hypsibius dujardini* (Parachaela: Hypsibiidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 178(4): 919 - 923.
80. Foor W. 1983. Nematoda. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
81. Franceschi T. 1948. Anabiosis nei Tardigradi. Bollettino dei Musei e Degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, 22: 47 - 49.
82. Gabriel W., Goldstein B. 2007. Segmental expression of Pax3/7 and engrailed homologs in tardigrade development. Development Genes and Evolution, 217(6): 421 - 433.
83. Gabriel W., McNuff R., Patel S., Gregory T., Jeck W., Jones C., Goldstein B. 2007. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. Developmental Biology, 312(2): 545 - 559.

84. Gaino E., Mazzini M. 1990. Follicle cell activity in the ovarioles of *Harbophlebia eldae* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). Transactions of the American Microscopical Society, 109: 300 - 310.
85. Gaino E., Piersanti S., Rebora M. 2008. Egg envelope synthesis and chorion modification after oviposition in the dragonfly *Libellula depressa* (Odonata, Libellulidae). Tissue and Cell, 40(5): 317 - 324.
86. Ganot P., Bouquet J., Kallesøe T., Thompson E. 2007a. The *Oikopleura coenocyst*, a unique chordate germ cell permitting rapid, extensive modulation of oocyte production. Developmental Biology, 302(2): 591 - 600.
87. Ganot P., Kallesøe T., Thompson EM. 2007b. The cytoskeleton organizes germ nuclei with divergent fates and asynchronous cycles in a common cytoplasm during oogenesis in the chordate *Oikopleura*. Developmental Biology, 302(2): 577 - 590.
88. Garbiec A., Klimowicz M., Jędrzejowska I. 2016. Two types of germ cell clusters in the ovaries of podocopid ostracods. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica, 58(1): 73.
89. Garey J., Krotec M., Nelson D., Brooks J. 1996. Molecular analysis supports a tardigrade – arthropod association. Invertebrate Biology, 115(1): 79 - 88.
90. Garey J., McInnes S., Nichols P. 2008. Global diversity of tardigrades (Tardigrada) in freshwater. Hydrobiologia, 595: 101 - 106.
91. Gąsiorek P., Stec D., Morek W., Michalczyk Ł. 2018. An integrative redescription of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840), the nominal taxon for Hypsibioidea (Tardigrada: Eutardigrada). Zootaxa, 4415(1): 045 - 075.
92. Gilbert J. 1983. Rotifera. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
93. Glime J. 2017. Chapter 5 – Tardigrades. In: Bryophyte Ecology Volume 2: Bryological Interaction. Michigan Technological University. <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology2/5>.
94. Gorgoń Sz., Krodkiewska M., Świątek P. 2015. Ovary ultrastructure and oogenesis in *Propappus volki* Michaelsen 1916 (Annelida: Clitellata). Zoologischer Anzeiger, 257: 110 - 118.
95. Greenbaum M., Yan W., Wu M., Lin Y., Agno J., Sharma M., Braun R., Rajkovic A., Matzuk M. 2006. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male

- mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(13): 4982 - 4987.
96. Greenbaum M, Iwamori T., Buchold GM., Matzuk MM. 2011. Germ cell intercellular bridges. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3(8): a005850. doi: 10.1101/cshperspect.a005850.
 97. Greven H. 1979. Notes on the structure of vasa Malpighii in the eutardigrade *Isohypsibius augusti* (Murray 1907). Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace Zoologiczne, 25: 87 - 95.
 98. Greven H. 1980. Die Bärtierchen. Ziemsen Verlag, Wittenberg.
 99. Greven H. 1984. Tardigrada. In: Biology of the Integument, Bereiter - Hahn J., Matoltsky A., Richards K. (eds). Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, 55 - 76.
 100. Grigarick A. Schuster R., Toftner E. 1973. Descriptive morphology of eggs of some species in the *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada: Macrobiotidae). The Pacific Coast Entomological Society, 49: 258 - 263.
 101. Grimaldi de Zio S., D'Addabbo Gallo M., Morone de Lucia M., D'Addabbo L. 1987. Marine Arthrotardigrade and Echiniscoidea (Tardigrada, Heterotardigrada) from the Indian Ocean. Bollettino di Zoologia 54(4): 347 - 357. doi: 10.1080/11250008709355608.
 102. Grimaldi de Zio S., Engel M. 2005. Evolution of the Insects, Cambridge Evolution Series, Cambridge, 96 - 97.
 103. Gross V. and Mayer G. 2015. Neural development in the tardigrade *Hypsibius dujardini* based on anti-acetylated α -tubulin immunolabeling. Evo Devo, 6: 12. doi: 10.1186/s13227-015-0008-4.
 104. Gross V., Bährle R., Mayer G. 2018. Detection of cell proliferation in adults of the water bear *Hypsibius dujardini* (Tardigrada) via incorporation of a thymidine analog. Tissue and Cell, 51: 77 - 83. doi: 10.1016/j.tice.2018.03.005.
 105. Gross V., Minich I. & Mayer G. 2017. External morphogenesis of the tardigrade *Hypsibius dujardini* as revealed by scanning electron microscopy. Journal of Morphology, 278(4): 563 - 573. doi: 10.1002/jmor.20654.
 106. Guidetti R., Boschini D., Rebecchi L. and Bertolani R. 2006. Encystment processes and the “Matrioshka-like stage” in a moss-dwelling and in a limnic species of eutardigrades (Tardigrada). Hydrobiologia, 558(1): 9 - 21.
 107. Guidetti R., Altiero T., Rebecchi L. 2011. On dormancy strategies in tardigrades. Journal of Insect Physiology, 57: 567 - 576.

108. Guidi A., Rebecchi L. 1996. Spermatozoan morphology as a character for tardigrade systematics: comparison with sclerified parts of animals and eggs in eutardigrades. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 116: 101 - 113.
109. Guo G., Zheng G. 2004. Hypotheses for the functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms. *Journal of Theoretical Biology*, 229(1): 139 - 146.
110. Gutzeit H. 1986. Transport of molecules and organelles in meroistic ovarioles of insects. *Differentiation*, 31(3): 155 - 165.
111. Haglund K., Nezis I., Stenmark H. 2011. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Communicative & Integrative Biology*, 4(1): 1 - 9.
112. Hering L., Bouameur J., Reichelt J., Magin T., Mayer G. 2016. Novel origin of lamin-derived cytoplasmic intermediate filaments in tardigrades. *eLife*, 5, e11117. doi: 10.7554/eLife.11117.
113. Hickman C., Roberts L., Keen S., Eisenhour D., Larson A., I'Anson H. 2014. *Integrated Principles of Zoology*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
114. Hummon & Hummon 1983. Gastrotricha. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
115. Hyra M., Poprawa I., Włodarczyk A., Student S., Sonakowska L., Kszuk-Jendrysik M., Rost-Roszkowska M. 2016a. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840) (Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4), 897 - 906. <https://doi.org/10.1111/zoj.12467>.
116. Hyra M., Rost-Roszkowska M., Student S., Włodarczyk A., Deperas M., Janelt K., Poprawa I. 2016b. Body cavity cells of Parachela during their active life. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4): 878 - 887. <https://doi.org/10.1111/zoj.12463>.
117. Ikuta K., Maruo F., Tsutsumi T., Makioka T. 2007. Structure of the ovary and "nurse cells" in a freshwater ostracod, *Cyprinotus uenoi* Brehm (Podocopida: Cypridoidea). *Zoological Science*, 24(9): 906 - 912. doi: 10.2108/zsj.24.906.
118. Jaglarz M., Kubrakiewicz J., Biliński Sz. 2010. A novel pattern of follicular epithelium morphogenesis in higher dipterans. *Zoology*, 113(2): 91 - 99. doi: 10.1016/j.zool.2009.07.002.

119. Jaglarz M., Kubrakiewicz J., Biliński S. 2014a. The ovary structure and oogenesis in the basal crustaceans and hexapods. Possible phylogenetic significance. *Arthropod Structure and Development* 43(4): 349-360. doi: 10.1016/j.asd.2014.05.003.
120. Jaglarz M., Kubrakiewicz J., Jędrzejowska I., Gołdyn B., Biliński S. 2014b. Ultrastructural analysis of the ovary and oogenesis in Spinicaudata and Laevicaudata (Branchiopoda) and its phylogenetic implications. *Zoology*, 117(3): 207-215. doi: 10.1016/j.zool.2013.12.002.
121. Janelt K. 2017. Przebieg procesu oogenezy niesporczaka *Thulinus ruffoi* (Tardigrada, Eutardigrada). Praca magisterska. Uniwersytet Śląski, Katowice.
122. Janelt K., Jezierska M., Student S., Poprawa I. 2018. Germ cell cluster organisation and fate during oogenesis in Parachela. 14th International Symposium on Tardigrada, Copenhagen, 54.
123. Jura Cz. 2007. Bezkręgowce : podstawy morfologii funkcjonalnej, systematyki i filogenezy. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
124. Johnson J., Jones L. 1967. Behavior of nucleoli and contracting nucleolar vacuoles in tobacco cells growing in microculture. *American Journal of Botany*, 54(2):189 - 198.
125. Jönsson K., Guidetti R. 2001. Effects of methyl bromide fumigation on anhydrobiotic metazoans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50, 72 - 75.
126. Jönsson K., Bertolani R. 2001. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. *Journal of Zoology*, 257:181 - 187. doi.org/10.1017/S0952836901001169.
127. Jönsson K., Rabbow E., Schill R., Harms-Ringdahl M., Rettberg P. 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, 18(17): R729 - R731.
128. Jönsson K., Rebecchi L. 2002. Experimentally induced anhydrobiosis in the Tardigrade *Richtersius coronifer*: Phenotypic factors affecting survival. *Journal of Experimental Zoology*, 293(6): 578 - 584.
129. Kaczmarek Ł. 2013. Niesporczaki – Tardigrada, W: Błaszak C., Zoologia: Bezkręgowce, Tom1, część II, wyd. II-zmienione, PWN, Warszawa, 694 - 702.
130. Kambyseilis M. 1993. Ultrastructural diversity in the egg chorion of Hawaiian *Drosophila* and *Scaptomyza*: ecological and phylogenetic considerations. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 22(2-4): 417 – 446. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(93\)90022-S](https://doi.org/10.1016/0020-7322(93)90022-S).
131. Kaulenas M. 1992. Insect Accessory Reproductive Structures. Function, Structure and Development. (In: Zoophysiology, vol. 31. S. D. Bradshaw, W. Burggren, H. C.

- Heller, S. Ishii, H. Langer, G. Neuweiler, D. J. Randall eds. Springer-Verlag, Berlin): 38 - 75.
132. Kinchin I. 1994. The Biology of Tardigrades. Portland Press, London.
133. Kisiel E., Klag J. 2001. Development of terminal filaments and ovariole envelopes in *Thermobia domestica* (Insecta, Zygentoma) larvae. *Folia Biologica* (Kraków), 49(3-4): 199 - 204.
134. Kosztyla P., Stec D., Morek W., Gąsior P., Zawierucha K., Michno K., Ufir K., Małek D., Hlebowicz K., Laska A., Dudziak M., Frohme M., Prokop Z., Kaczmarek Ł., Michalczyk, Ł. 2016. Experimental taxonomy confirms the environmental stability of morphometric traits in a taxonomically challenging group of microinvertebrates. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4): 765 - 775.
135. Kot M., Büning J., Jankowska W., Drohojowska J., Szklarzewicz T. 2016. Development of ovary structures in the last larval and adult stages of psyllids (Insecta, Hemiptera, Sternorrhyncha: Psylloidea). *Arthropod Structure & Development*, 45(4): 389 - 398.
136. Kristensen R. 1979. On the fine structure of *Batillipes noerrevangi* Kristensen, 1978 (Heterotardigrada). 3. Spermiogenesis. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace Zoologiczne*, 25: 97 - 105.
137. Krzysztofowicz A., Kisiel E. 1989. Further studies on the morphogenesis of the first and second egg envelopes of *Tetrodontophora bielanensis* (Wega) (Collembola). 3-rd Int. Seminar on Apterygota. R. Dallai (ed.) University of Siena, 221 - 228.
138. Kubrakiewicz J. 1985. Różnicowanie komórek płciowych i rozwój gonady ślimaków płucodysznych (Gastropoda, Pulmonata). *Przegląd Zoologiczny*, 29(2): 149 - 159.
139. Kubrakiewicz J. 1991a. Ovary structure and oogenesis of *Polyxenus lagurus* (L.) (Diplopoda, Pselaphognatha). *Zoologische Jahrbücher Anatomie*, 121: 81 - 93.
140. Kubrakiewicz J. 1991b. Ultrastructural investigation of the ovary structure of *Ophiulus pilosus* (Myriapoda, Diplopoda). *Zoomorphology*, 110(3): 133 - 138.
141. Kubrakiewicz J. 1997a. Germ cells cluster organization in polytrophic ovaries of Neuroptera. *Tissue and Cell*, 29(2): 221 - 228.
142. Kubrakiewicz J. 1997b. Strategie gromadzenia rRNA w komórkach jajowych zwierząt. *Postępy Biologii Komórki*, 24(9): 65 - 79.

143. Kubrakiewicz J. 1999. Struktura i funkcja zespołów komórek płciowych w politroficznych owariolach sieciarek (Insecta: Neuroptera). Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Wrocławski, Wrocław.
144. Kubrakiewicz J., Jędrzejowska I., Biliński Sz. 1998. Neuropteroidea - Different ovary structure in related groups. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 36(4):179 - 87.
145. Kubrakiewicz J., Klimowicz M. 1994. The ovary structure in *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura). *Zoologica Poloniae*, 39(1-2): 7 - 17.
146. Kubrakiewicz J., Klimowicz M. 1995. Budowa cewki jajnikowej *Cyclocypris* sp. (Crustacea, Ostacoda). Materiały XX Konferencji Embriologicznej, Rudy Raciborskie, 24.
147. Kumar V., Morrison M., Babu A. and Thiagrajan V. 2002. Egg shell architecture of the stink bug, *Eocanthecona furcellata* (Wolff.): Ultrastructure of micropylar processes and egg burster. *International Journal of Tropical Insects Science*, 22(1): 67 - 73.
148. Kumar V., Kariappa B., Babu A. and Dandin S. 2007. Surface Ultrastructure of the Egg Chorion of Eri Silkworm, *Samia ricini* (Donovan) (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Entomology*, 4(2): 68 - 81.
149. Kunkel J., Nordin J. 1985. Yolk proteins. W: *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 1. G.A. Kerkut, L. I. Gilbert (red.). Pergamon Press, Oxford: 83 - 114.
150. Klag J. 1978. Oogenesis in *Acerentomon gallicum* Jonescu (Protura). An ultrastructural analysis of the early previtellogenic stages. *Cell and Tissue Research* 189(2): 365 - 374.
151. Klimowicz M. 2002. Struktura jajnika meroistycznego i oogeneza małżoraczka *Cupris pubera* O. F. Müller, 1776 (Crustacea, Ostracoda). Rozprawa doktorska. Uniwersytet Wrocławski, Wrocław.
152. Kloc M., Biliński Sz., Dougherty M., Brey E., Etkin L. 2004. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 266(1): 43 - 61.
153. Kloc M., Jaglarz M., Dougherty M., Steward M., Nel-Themaatt L., Biliński Sz. 2008. Mouse early oocytes are transiently polar: Three-dimensional and ultrastructural analysis. *Experimental Cell Research*, 314(17): 3245 - 3254. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.007.

154. Lavine M., Strand M. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10): 1295 - 1309.
155. Lechowska A., Biliński Sz., Choi Y., Shin Y., Kloc M., Rajkovic A. 2011. Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(7): 583 - 589. doi: 10.1007/s10815-011-9553-5.
156. Lewis W. 1943. Nucleolar vacuoles in living normal and malignant fibroblasts. *Cancer Research*, 3(8):531 - 536.
157. Levin M., Anavy L., Cole A., Winter E., Mostov N., Khair S., Senderovich N., Kovalev E., Silver D., Feder M., Fernandez-Valverde S., Nakanishi N., Simmons D., Simakov O., Larsson, T., Liu S., Jerafi-Vider A., Yaniv K., Ryan J., Martindale M., Rink J., Arendt D., Degnan S., Degnan B., Hashimshony T., Yanai, I. 2016. The mid-developmental transition and the evolution of animal body plans. *Nature*, 531, 637 - 641.
158. Lupa B. 2002. Structure of the terminal filaments in the ovaries of cicadomorpha with special reference to distribution of the cytoskeleton. Abstract of a communication presented at the XXVth Conference on Embryology, Wrocław, *Zoologica Poloniae*, 47: 47.
159. Lupa B., Kim J., Biliński Sz. 1999. The ovary of *Neotitura kongosana* (Hemiptera, Cicadomorpha: Ledridae). Ultrastructure of the tropharium and terminal filament. *Folia Biologica (Kraków)*, 47(3-4): 123 - 130.
160. Mainitz M. 1983. Gnathostomulida. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
161. Małota K., Student S., Świątek P. 2018. Low mitochondrial activity within developing earthworm male germ-line cysts revealed by JC-1. *Mitochondrion* <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.01.007>.
162. Marcus E. 1928. Spinnentiere oder Arachnoidea. IV: Bärtierchen (Tardigrada). In: Dahl F. (Ed.) *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile nach ihren Merkmalen und nach ihrer Lebensweise*. 12 Teil. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
163. Marcus E. 1929. Tardigrada. In: Bronn HG (ed) *Klassen und Ordnungen des Tierreichs*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1 - 609.

164. Margaritis L. 1985. Structure and physiology of the egg-shell. (In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 1. Embriogenesis and reproduction. G. A. Kertut, L. J. Gilbert eds. Pergamon, Oxford): 153 - 230.
165. Marmaras V., Lampropoulou M. 2009. Regulators and signaling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, 21(2): 186 - 195.
166. Matova N., Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental Biology*, 231(2): 291- 320. doi: 10.1006/dbio.2000.0120.
167. Mayer G. 2007. *Metaperipatus inae* sp. nov. (Onychophora: Peripatopsidae) from Chile with a novel ovarian type and dermal insemination. *Zootaxa*, 1440(1): 21 - 37. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.1440.1.2>.
168. Mayer G., Harzsch S. 2008. Distribution of serotonin in the trunk of *Metaperipatus blainvillei* (Onychophora, Peripatopsidae): implications for the evolution of the nervous system in Arthropoda. *Journal of Comparative Neurology*, 507(2): 1196 - 1208.
169. Mayer G., Martin C., Rüdiger J., Kauschke S., Stevenson P., Poprawa I., Hohberg K., Schill R., Pflüger H., Schlegel M. 2013. Selective neuronal staining in tardigrades and onychophorans provides insights into the evolution of segmental ganglia in panarthropods. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1):230. doi: 10.1186/1471-2148-13-230.
170. Mayer G., Tait N. 2009. Position and development of oocytes in velvet worms shed light on the evolution of the ovary in Onychophora and Arthropoda. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157(1): 17 - 33.
171. May R. 1948. *La vie des Tardigrades*. Paris: Histories Naturelles.
172. Mazzini M., Callaini G., Mencarelli C. 1984. A comparative analysis of the evolution of the egg envelopes and the origin of the yolk. *Bolletino di zoologia*, 51(1-2): 35 - 101.
173. Mazzini T., Gaino E. 1988. Oogenesis of the mayfly *Habrophlebia eldae*: synthesis of vitelline and chorionic envelopes. *Gamete Research*, 21(4): 439 - 450. doi: 10.1002/mrd.1120210411.
174. Mazzoni T., Grier H., Quagio-Grassiotto I. 2010. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *Anatomical Record (Hoboken)*, 293(9): 1581 - 606. doi: 10.1002/ar.21205.
175. Meusemann K., von Reumont B., Simon S., Roeding F., Strauss S., Kück P., Ebersberger I., Walzl M., Pass G., Breuers S., Achter V., von Haeseler A., Burmester

- T., Hadrys H., Wägele J., Misof B. 2010. A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Molecular Biology and Evolution*, 27(11): 2451 - 64. doi: 10.1093/molbev/msq130.
176. Michalik A., Szklarzewicz T., Węgierek P., Wieczorek K. 2013. The ovaries of aphids (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea): morphology and phylogenetic implications. *Invertebrate Biology*, 132(3): 226 - 240. doi: 10.1111/ivb.12026.
177. Moosbrugger M., Schwaha T., Walzl M., Obst M., Ostrovsky A. 2012. The placental analogue and the pattern of sexual reproduction in the cheilostome bryozoan *Bicellariella ciliata* (Gymnolaemata). *Frontiers in Zoology*, 9(29): 1 - 20.
178. Müller K., Walossek D., Zakharov A. 1995. 'Orsten' type phosphatized soft-integument preservation and a new record from the Middle Cambrian Kuonamka formation in Siberia. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie - Abhandlungen* 197(1): 101 - 118.
179. Nelson D. 2002. Current status of the tardigrada: evolution and ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3): 652 - 659.
180. Nelson D., Marley N., Bertolani R. 1999. Re-description of the genus *Pseudobiotus* (Eutardigrada, Hypsibiidae) and of the new type species *Pseudobiotus katmanae* sp. n. *Zoologischer Anzeiger*, 238: 311 - 317.
181. Nelson D., Guidetti R., Rebecchi L. 2010. Tardigrada. In: Thorp J.H., Covich A.P. (Eds) *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Academic 14: 455 - 484.
182. Nelson D., Guidetti R., Rebecchi L. 2015. Phylum Tardigrada. In: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates*. 4th edn. Vol. 1. Ecology and General Biology. Oxford: Elsevier, 347 - 380.
183. Nielsen C. 2001. *Animal evolution: Interrelationships of the living phyla*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
184. Norman J., Tait N. 2008. Ultrastructure of the Eggshell and Its Formation in *Planipapillus mundus* (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Morphology*, 269(10): 1263 - 1275.
185. Nørrevang A. 1983. Pentastomida. In: Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.). *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.

186. Ogorzałek A. 1987. Inductive effect of oocyte nucleus on ovarian follicle morphogenesis in water bugs Heteroptera. (In) Recent Advances in Insect Embryology in Japan and Poland. H. Ando and Cz. Jura eds. Arthropodan Embryological Society of Japan, 51 - 67.
187. Olszewska M. 1983. Jądro komórkowe. W: Kawiak J., Mirecka J., Warchoń J. (red.). Podstawy cytofizjologii. wyd. III. PWN. Warszawa, 142 - 143.
188. Ou Q., Shu D., Mayer G. 2012. Cambrian lobopodians and extant onychophorans provide new insights into early cephalization in Panarthropoda, Nature communications, 1 - 7. doi: : 10.1038/ncomms2272.
189. Özyurt N., Candan S., Suludere Z. 2013. The morphology and histology of the female reproductive system of *Graphosoma lineatum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) based on light and scanning electron microscope studies. International Journal of Scientific Research, 2(12): 42 - 46. doi: 10.15373/22778179/DEC2013/14.
190. Pennak R. 1978. Fresh-water invertebrates of United States. John Wiley & Sons, Inc. New York: 239 - 253.
191. Pepling M., de Cuevas M., Spradling A. 1999. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? Trends in Cell Biology, 9(7): 257 - 62.
192. Pepling M. 2006. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development. Genesis, 44(12): 622 - 632. doi: 10.1002/dvg.20258.
193. Persson D., Halberg K., Jorgensen A., Mobjerg N. & Kristensen R. 2012. Neuroanatomy of *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae): Tardigrade brain structure supports the clade panarthropoda. Journal of Morphology, 273(11): 1227 - 1245. doi: 10.1002/jmor.20054.
194. Pollock L. 1970. Reproductive anatomy of some marine Heterotardigrada. Transactions of the American Microscopical Society, 89 (2): 308 - 316.
195. Poprawa I. 2003. Struktura jajnika oraz przebieg oogenezy u niesporczaka *Dactylobiotus dispar* Murray, 1907 (Tardigrada, Eutardigrada). Rozprawa doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice.
196. Poprawa I. 2005a. The ovary structure, previtellogenic and vitellogenic stages in parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). Tissue and Cell, 37(5): 385 - 392. doi: 10.1016/j.tice.2005.06.003.

197. Poprawa I. 2005b. The structure and the formation of egg shells in parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* Murray, 1097 (Tardigrada: Eutardigrada). *Folia Biologica* (Kraków), 53: 173 - 177.
198. Poprawa I. 2006. Ultrastructural changes of the storage cells during oogenesis in *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). *Zoologica Poloniae*, 51(1-4): 13 - 18.
199. Poprawa I. 2011. Ultrastructural studies of the formation of egg capsule in the hermaphroditic species, *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Zoological Science*, 28(1): 37 - 40.
200. Poprawa I., Baran A., Rościszewska E. 2002. Structure of ovaries and formation of egg envelopes in the stonefly, *Leuctra autumnalis* Aubert, 1948 (Plecoptera: Leuctridae). *Ultrastructural studies. Folia Biologica* (Kraków), 50: 29 - 38.
201. Poprawa I., Galus P. 2007. Oogeneza niesporczaków. *Przegląd Zoologiczny*, 51(1-2): 7 - 18.
202. Poprawa I., Grzywa K. 2006. Ultrastructure of the young gonad of the hermaphroditic species *Isohypsibius granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada: Eutardigrada). *Acta Biologica Cracoviensia*, 48(1): 62.
203. Poprawa I., Hyra M., Kszuk-Jendrysik M., Rost-Roszkowska M. 2015a. Ultrastructural changes and programmed cell death of trophocytes in the gonad of *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Micron*, 70: 26 - 33. doi: 10.1016/j.micron.2014.11.008.
204. Poprawa I., Hyra M., Rost-Roszkowska M. 2015b. Germ cell cluster organization and oogenesis in the tardigrade *Dactylobiotus parthenogeneticus* Bertolani, 1982 (Eutardigrada, Murrayidae). *Protoplasma*, 252(4): 1019 - 29. doi: 10.1007/s00709-014-0737-6.
205. Poprawa I., Schlechte W., Hyra M. 2015c. Ovary organization and oogenesis in the tardigrade *Macrobiotus polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003 (Eutardigrada, Macrobiotidae): ultrastructural and histochemical analysis. *Protoplasma*, 252(3): 857 - 865. doi: 10.1007/s00709-014-0725-x.
206. Poprawa I., Hyra M., Janelt K., Kszuk - Jendrysik M., Rost – Roszkowska M. 2015d. What is known about oogenesis in Eutardigrada? W: 13th International Symposium on Tardigrada. Modena, Włochy, 41.

207. Postlethwait J., Giorgi F. 1985. Vitellogenesis in Insects. (In) Browder L.W. (ed.). Development biology. A comprehensive synthesis. Volume 1: Oogenesis. New York: Plenum Press, 85 - 136.
208. Philips B., Gassei K., Orwig K. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1546): 1663 - 78. doi: 10.1098/rstb.2010.0026.
209. Pyka-Fościak G., Jankowska W., Szklarzewicz T. 2003. Ultrastructural studies on the formation of egg envelopes in fulgoromorphans (Insecta, Hemiptera, Fulgoromorpha: Dictyopharidae). Folia Biologica (Kraków) 51: 171 - 179.
210. Rahm G. 1925. Die Cystenbildung bei den wasserbewohnen den Tardigraden. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen 3: 364 - 371.
211. Ramazzotti G. 1962. Il Phylum Tardigrada. Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia, 16:1 - 595.
212. Ramazzotti G., Maucci W. 1983. Il Phylum Tardigrada. III edizione riveduta e aggiornata. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia 41: 1 - 1012 (An English translation, edited by Dr. Clark Beasley).
213. Raška I., Shaw P., Cmarko D. 2006. New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. International Review of Cytology, 255: 177 - 235. doi: 0.1016/S0074-7696(06)55004-1.
214. Raven C. 1961. Oogenesis: the storage of developmental information. Pergamon Press. Oxford.
215. Rehm P., Borner J., Meusemann K., von Reumont B., Simon S., Hadrys H., Misof B., Burmester T. 2011. Dating the arthropod tree based on large-scale transcriptome data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 61(3): 880 - 887. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.003>.
216. Renaud-Dobysier J. 1965. *Parastygarcus higginsi* n.g., n. sp., Tardigrade marin interstitial de Madagascar. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris), 260: 955 - 957.
217. Rebecchi L., Guidi A. 1991. First SEM studies on tardigrade spermatozoa. Invertebrate Reproduction and Development, 19(2): 151 - 156. <https://doi.org/10.1080/07924259.1991.9672169>.

218. Rebecchi L., Guidi A, Bertolani R. 2000. Maturative pattern of the ovotestis in two hermaphrodite species of eutardigrades. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37(1): 25 - 34.
219. Rehm P., Borner J., Meusemann K., von Reumont B., Simon S., Hadrys H., Misof B., Burmester T. 2011. Dating the arthropod tree based on large-scale transcriptome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3): 880 - 887. doi: 10.1016/j.ympev.2011.09.003.
220. Reuner A., Hengherr S., Brümme F., Ralph O., Schill R. 2010. Comparative studies on storage cells in tardigrades during starvation and anhydrobiosis. *Current Zoology*, 56(2): 259 - 263.
221. Reynolds E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17: 208 - 212.
222. Richters F. 1911. Faune des Mousses. Tardigrades. Duc de l'Orleans, Campagne arctique de 1907, 4: 1 – 20 + plates I – II.
223. Robinson D., Cooley L. 1996. Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. *Trends in Cell Biology*, 6(12): 474 - 479.
224. Roeding F., Hagner-Holler S., Ruhberg H., Ebersberger I., von Haeseler A., Kube M., Reinhardt R., Burmester T. 2007. EST sequencing of Onychophora and phylogenomic analysis of Metazoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(3): 942 - 51.
225. Roosen-Runge E. 1962. The process of spermatogenesis in mammals. *Biological Reviews*, 37: 343 - 377.
226. Rosati F. 1968. Ricerche di microscopia elettronica sui Tardigradi, 2. I globuli cavitari. *Atti dell'Accademie dei Fisiocritici*, Siena, 17: 1439 - 1452.
227. Roser B. 2006. Stable liquid vaccines and drugs for the 21st century. *Future Microbiology*, 1(1): 21 - 31. doi: 10.2217/17460913.1.1.21.
228. Rost-Roszkowska M., Poprawa I., Wójtowicz M., Kaczmarek Ł. 2011. Ultrastructural changes of the midgut epithelium in *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada: Eutardigrada) during oogenesis. *Protoplasma*, 248(2): 405 - 414. doi: 10.1007/s00709-010-0186-9.
229. Rościszewska E. 1991a. Morphological changes developing after oviposition on egg capsule surface of *Isoperla rivulorum* (Plecoptera: Perlodidae). *Zoologische Jahrbücher Anatome*, 121(3): 253 - 258.
230. Rościszewska E. 1991b. Ultrastructural and histochemical studies of the egg capsules of *Perla marginata* (Panzer, 1799) and *Dinocras cephalotes* (Curtis, 1827)

- (Plecoptera: Perlidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 20(4-5): 189 - 203. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(91\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0020-7322(91)90009-X).
231. Rościszewska E. 1994. Osłony jajowe. W Biliński Sz., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J. (eds). *ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6 Oogeneza*. PWN, Warszawa.
 232. Rościszewska E. 1995. Oogenesis of Stone Flies. Development of the follicular epithelium and formation of the egg-shell in ovaries of *Perla marginata* (Panzer) and *Perla pallida* Guerin (Plecoptera: Perlidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 24(3): 253 - 271. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(95\)00003-M](https://doi.org/10.1016/0020-7322(95)00003-M).
 233. Rościszewska E. 1996. Egg capsule structure of the stone-fly *Protonemura intricata* (Ris, 1902) (Plecoptera: Nemuridae). *Acta Biologica Cracoviensia. Série Zoologie*, 38: 41 - 49.
 234. Rościszewska E. 2003. Budowa i rozwój jajników oraz choriogeneza i ultrastruktura kapsuł jajowych widelnic (Insecta: Plecoptera). Wyd. I, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
 235. Rota-Stabelli O., Kayal E., Gleeson D., Daub J., Boore J., Telford M., Pisani D., Blaxter M., Lavrov D. 2010. Ecdysozoan mitogenomics: Evidence for a common origin of the legged invertebrates, the Panarthropoda. *Genome Biology and Evolution*, 2: 425 - 440. doi: 10.1093/gbe/evq030.
 236. Sareen L. & Adiyodi K. 1983. Arthropoda – Myriapoda. In. Adiyodi K. & Adiyodi R. (eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I Oogenesis, Oviposition and Absorption*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
 237. Schill R., Mali B., Dandekar T., Schnolzer M., Reuter D., Frohme M. 2009. Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: New perspectives for preservation and stabilization of biological material. *Biotechnology Advances*, 27(4): 348 - 352.
 238. Schmidt-Rhaesa A., Bartolomaeus T., Lemburg C., Ehlers U., Garey J. 1998. The position of the Arthropoda in the phylogenetic system. *Journal of Morphology*, 238(3): 263 - 285.
 239. Schmidt-Rhaesa A. 2001. Tardigrades – are they really miniaturized dwarfs? *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4): 549 - 255. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00066>.
 240. Siekierska E. 2003. The structure of the ovary and oogenesis in the earthworm, *Dendrobena veneta* (Annelida Clitellata). *Tissue & Cell*, 35(4): 252 - 259.

241. Simiczyjew B. 1994. Egg morphology and chorion fine structure of *Hydrometra stagnorum* (Heteroptera). *Zoologica Poloniae*, 39: 79 - 86.
242. Simiczyjew B., Ogorzałek A., Stys P. 1998. Heteroptera ovaries: Variations of the theme. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 36: 147 - 156.
243. Smith F., Bartels, P., Goldstein B. 2017. A Hypothesis for the Composition of the Tardigrade Brain and its Implications for Panarthropod Brain Evolution. *Integrative and Comparative Biology*, 57(3): 546–559. <https://doi.org/10.1093/icb/icx081>.
244. Smith F., Jockusch E. 2014. The metameric pattern of *Hypsibius dujardini* (Eutardigrada) and its relationship to that of other panarthropods. *Frontiers in Zoology*, 11: 66. <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0066-9>.
245. Sommer B., Oprins A., Rabouille C., Munro S. 2005. The exocyst component Sec5 is present on endocytic vesicles in the oocyte of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Cell Biology*, 169(6): 953 - 963. doi: 10.1083/jcb.200411053.
246. Soumaré M., Ndiaye M. 2005. Ultrastructural studies of mosquito ovogenesis. *Tissue & Cell*, 37(2): 117 - 124. doi: 10.1016/j.tice.2004.11.001.
247. Spalek – Wołczyńska A. 2002. Struktura jajnika i przebieg oogenezy u pijawki rybiej *Piscicola geometra* L. (Hirudinea, Piscicolidae). Rozprawa doktorska, Uniwersytet Śląski.
248. Spalek-Wołczyńska A., Klag J., Bielecki A., Świętek P. 2008. Oogenesis in Four Species of *Piscicola* (Hirudinea, Rhynchobdellida). *Journal of Morphology*, 269(1): 18 - 28.
249. Stec D., Gąsior P., Morek W., Koszyła P., Zawierucha K., Michno K., Kaczmarek Ł., Prokop Z. & Michalczyk Ł. 2016. Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178: 776 - 784. doi: 0.1111/zoj.12404.
250. Stępiński D. 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma*, 251(6): 1285 - 306. doi: 10.1007/s00709-014-0648-6.
251. Suzuki A. 2006. Ovarian structure in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada: Milnesiidae) during early vitellogenesis. *Hydrobiologia*, 558: 61 - 66. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1416-6>.
252. Szklarzewicz T. 1989. Ultrastructural studies on the vitellogenesis of *Nicoletia phytophila* (Zygentoma, Nicoletiidae). *Zoologische Jahrbücher Anatome*, 118: 483 - 491.

253. Szklarzewicz T. 1994. Witelogeneza owadów. W: Biliński Sz., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J., Przełęcka A. (red). Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6 Oogeneza. PWN, Warszawa, 61 - 71.
254. Szklarzewicz T., Kędra K., Niżnik S., 2005. Ultrastructural studies of the ovary of *Palaeococcus fuscipennis* (Burmeister) (Insecta, Hemiptera, Coccinea: Monophlebidae). *Folia Biologica* (Kraków), 53(1-2): 45 - 50.
255. Szymańska B. 1994. Interdependence between storage bodies and egg developmental stages in *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911 (Tardigrada). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Zoologia*, 36: 41 - 50.
256. Szymańska B. 1995. Encystment in the tardigrade *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). Observation of leaving animals and structure of cyst. *Zoologica Poloniae*, 40: 91 - 102.
257. Świątek P. 2008. Ovary cord structure and oogenesis in *Hirudo medicinalis* and *Haemopis sanguisuga* (Clitellata, Annelida): remarks on different ovaries organization in Hirudinea. *Zoomorphology*, 127(4): 213 - 226. doi: 10.1007/s00435-008-0065-5.
258. Świątek P., Kubrakiewicz J., Klag J. 2009. Formation of germ-line cyst with a central cytoplasmic core is accompanied by specific orientation of mitotic spindles and partitioning of existing intercellular Bridges. *Cell and Tissue Research*, 337(1): 137 - 148. doi: 10.1007/s00441-009-0788-8.
259. Świątek P., Urbisz A.Z., Strużyński W., Płachno B.J., Bielecki A., Cios S., Salonen E., Klag J. 2012. Ovary architecture of two branchiobdellid species and *Acanthobdella peledina* (Annelida, Clitellata). *Zoologischer Anzeiger*, 251(1): 71 - 82. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2011.08.001>.
260. Świątek P., Małota K., Hyra M., Gorgoń Sz., Poprawa I. 2014. Stabilne mostki międzykomórkowe - kanały komunikacji międzykomórkowej. *Postępy Biologii Komórki*, 41(3): 507 - 532.
261. Świątek P., Płachno B., Marchant R., Gorgoń S., Krodkiewska M., Małota K., Urbisz A. 2016. Germ-line cells do not form syncytial cysts in the ovaries of the basal clitellate annelid *Capilloventer australis*. *Zoologischer Anzeiger*, 260: 63 - 71. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.12.002>.
262. Telfer W. 1975. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. *Advances in Insect Physiology*, 11: 223 - 319.

263. Telfer W. 2009. Egg formation in Lepidoptera. *Journal of Insect Science*, 9(50): 1 - 21. doi: 10.1673/031.009.5001.
264. Telford M., Bourlat S., Economou A., Papillon D., Rota-Stabelli O. 2008. The evolution of the Ecdysozoa. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1496): 1529 - 1537.
265. Tenlen J., McCaskill S., Goldstein B. 2013. RNA interference can be used to disrupt gene function in tardigrades. *Development Genes and Evolution*, 223(3): 171 - 181. doi: 10.1007/s00427-012-0432-6.
266. Thomsen E., Hansen B., Hansen G., Jensen P. 1980. Ultrastructural Immunocytochemical Localization of Vitellogenin in the Fat Body of the Blowfly, *Calliphora vicina* Rob.-Desv. (erythrocephala Meig.) by Use of the Unlabeled Antibody-Enzyme Method. *Cell and Tissue Research*, 208: 445 – 455.
267. Thulin G. 1928. Über die Phylogenie und das System der Tardigraden. *Hereditas*, 11: 207 - 266.
268. Toftner E., Grigaric A., Schuster R. 1975. Analysis of scanning electron microscopes images of *Macrobiotus* eggs. In: Haggins R. (ed.) *Proceedings of the first international symposium on tardigrades*. *Memoirs Institute Italian Idrobiology*, 32: 393 - 411.
269. Trentini M., Scanabissi F. 1979. Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). *Cell and Tissue Research*, 194(1): 71 - 77.
270. Tworzydło W., Biliński Sz. 2008. Structure of ovaries and oogenesis in dermapterans. I. Origin and functioning of the ovarian follicles. *Arthropod Structure and Development*, 37(4): 310 - 320. doi: 10.1016/j.asd.2008.01.002.
271. Tworzydło W., Kisiel E. 2009. Structure of Ovaries and Oogenesis in Dermapterans. II. The Nurse Cells, Nuage Aggregates and Sponge Bodies. *Folia Biologica (Kraków)*, 58(1-2): 67 - 72.
272. Tworzydło W., Kisiel E., Jankowska W., Bilinski Sz. 2014. Morphology and ultrastructure of the germarium in panoistic ovarioles of a basal "apterygotous" insect, *Thermobia domestica*. *Zoology (Jena)*, 117(3): 200 - 206. doi: 10.1016/j.zool.2014.01.002.
273. Urbisz A., Chajec Ł., Brąszewska-Zalewska A., Kubrakiewicz J., Świątek P. 2017. Ovaries of the white worm (*Enchytraeus albidus*, Annelida, Clitellata) are composed

of 16-celled meroistic germ-line cysts. *Developmental Biology*, 426(1): 28 - 42. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.04.009.

274. Urbisz A., Chajec Ł., Świątek P. 2015. The ovary of *Tubifex tubifex* (Clitellata, Naididae, Tubificinae) is composed of one, huge germ-line cyst that is enriched with cytoskeletal components. *PLoS One* 10: 1 - 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126173>.
275. Urbisz A., Krodkiewska M., Świątek P. 2010. Ovaries of Tubificinae (Clitellata, Naididae) resemble ovary cords found in Hirudinea (Clitellata). *Zoomorphology*, 129(4): 235 - 247. doi: 10.1007/s00435-010-0116-6.
276. Urbisz A., Świątek P. 2013. Ovary organization and oogenesis in two species of *Lumbriculida* (Annelida, Clitellata). *Zoology*, 116(2): 118 - 128. doi: 10.1016/j.zool.2012.10.003.
277. van de Velde M., Coomans A. 1988. Electron microscopy of the germ cells and the ovarian wall in *Xiphinema* (Nematoda). *Tissue & Cell*, 20(6): 881 - 890.
278. von Wenck W. 1914. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Tardigraden (*Macrobiotus lacustris* Duj.). *Zoologische Jahrbücher Anatome*, 37: 465 - 514.
279. Węlnicz W., Grohme M., Kaczmarek Ł., Schill R., Frohme M. 2011. Anhydrobiosis in tardigrades – the last decade. *Journal of Insect Physiology*, 57(5): 577 - 583. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.019.
280. Węglarska B. 1957. On the encystation in Tardigrada. Part First. *Zoologica Poloniae*, 8: 315 - 325.
281. Węglarska B. 1975. Studies on the morphology of *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911. *Memoirs Institute Italian Idrobiology*, 32: 445 - 464.
282. Węglarska, B. 1979. Electron microscope study of previtellogenesis and vitellogenesis in *Macrobiotus richtersi*. J Murr. (Eutardigrada). *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace Zoologiczne*, 25: 169 - 189.
283. Węglarska B. 1982. Ultrastructural study of the formation of egg envelopes in *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada). (In: *Proceedings of the Third international symposium on Tardigrada*. Nelson D. R. ed. East Tennessee State University Press): 115 -128.
284. Węglarska B. 1987. Yolk formation in *Isohypsibius* (Eutardigrada). *Zoomorphology*, 107: 287 - 292.

285. Wiederhöft H, Greven H. 1996. The cerebral ganglia of *Milnesium tardigradum* Doyère (Apochela, Tardigrada): three dimensional reconstruction and notes on their ultrastructure. Zoological Journal of the Linnean Society, 116(1-2): 71 - 84. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1996.tb02334.x>.
286. Wolburg-Buchholz K., Greven H. 1979. On the fine structure of the spermatozoon of *Isohypsibius granulifer* Thulin 1928 (Eutardigrada) with reference to its differentiation. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace Zoologiczne, 25: 191 - 197.
287. Vogelgesang M., Szklarzewicz T. 2001. Formation and structure of egg capsule in scale insects (Hemiptera, Coccinea) I. Ortheziidae. Arthropod Structure and Development, 30(1): 63 - 68. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(01\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(01)00021-4).
288. Volkman A., Greven H. 1993. Ultrastructural localization of tyrosinase in the tardigrade cuticle. Tissue & Cell, 25(3): 435 - 438.
289. Yoshida Y., Koutsovoulos G., Laetsch D., Stevens L., Kumar S., Horikawa D., Ishino K., Komine S., Kunieda T., Tomita M., Blaxter M. & Arakawa K. 2017. Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. PLoS Biology, 15(7), e2002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002266>.
290. Zantke J., Wolff C., Scholtz G., 2008. Three-dimensional reconstruction of the central nervous system of *Macrobiotus hufelandi* (Eutardigrada, Parachela): implications for the phylogenetic position of Tardigrada. Zoomorphology, 127(1):21 - 36. doi: 10.1007/s00435-007-0045-1.
291. Zawadzka M., Jankowska W., Biliński S. 1997. Egg shells of mallophagans and anoplurans (Insecta: Phthiraptera): morphogenesis of specialized regions and the relation to F-actin cytoskeleton of follicular cells. Tissue and Cell, 29(6): 665-673. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(97\)80042-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(97)80042-0).
292. Ząbczyk I. 1999. Wodne niedźwiadki – zarys biologii niesporczaków. Przegląd Zoologiczny, 43(3-4): 153 - 159.
293. Żelazowska M. 2005. Structure of the ovary and the differentiation of follicular epithelium in the Pig Louse, *Haematopinus suis* (Insecta: Phthiraptera). Folia Biologica (Kraków), 53(1-2): 51 - 60.
294. Żelazowska M. 2010. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). Journal of Fish Biology, 76(3): 694 - 706. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02527.x.

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt

MARTA JEZIERSKA

**Organizacja zespołów żeńskich komórek płciowych i przebieg procesu oogenezy
niesporczaka *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018
(Eutardigrada, Parachela, Hypsibiidae)**

TOM II

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

DR HAB. IZABELI POPRAWY

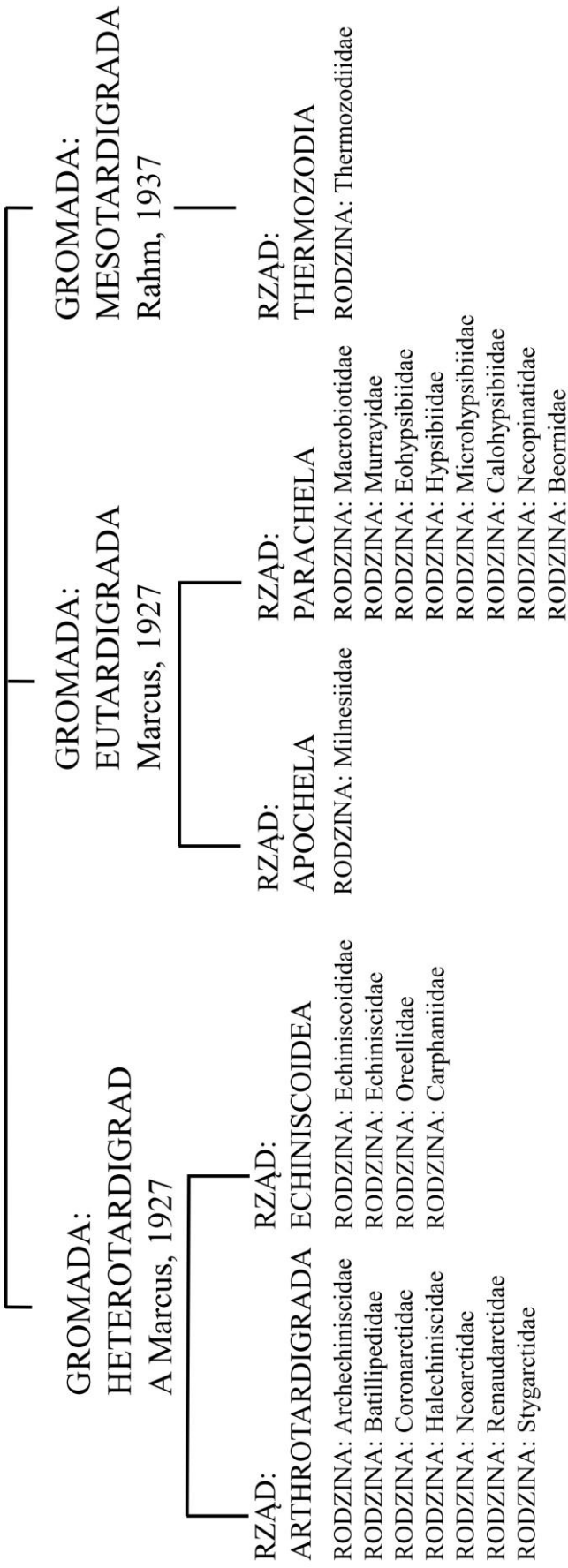
Badania częściowo finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu
PRELUDIUM UMO-2014/15/N/NZ4/04350

Katowice, 2018

11. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

Schemat 1. Systematyka Tardigrada.

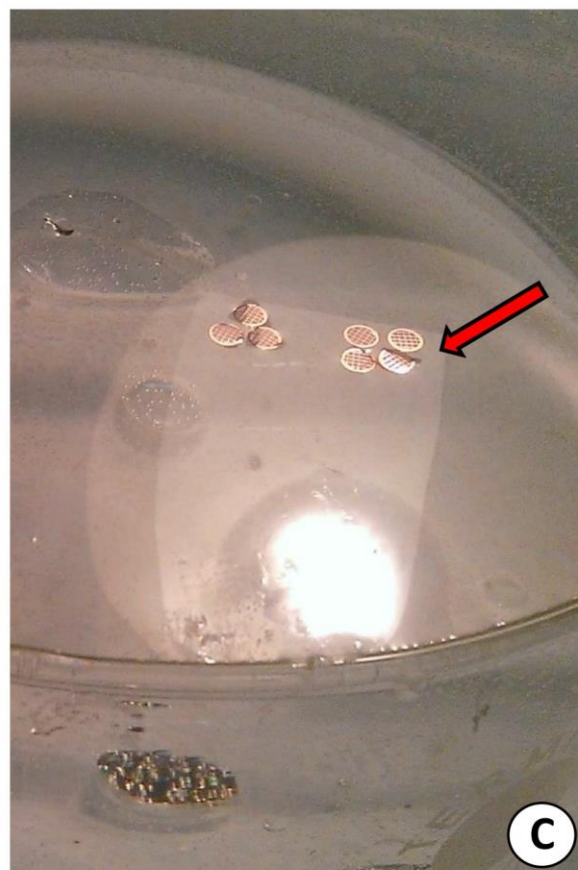
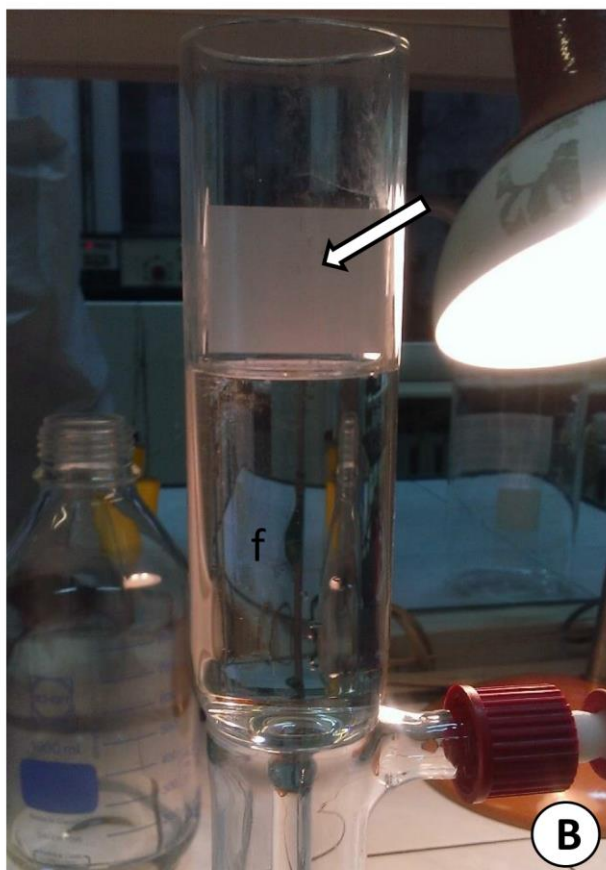
TYP: TARDIGRADA Doyère, 1840



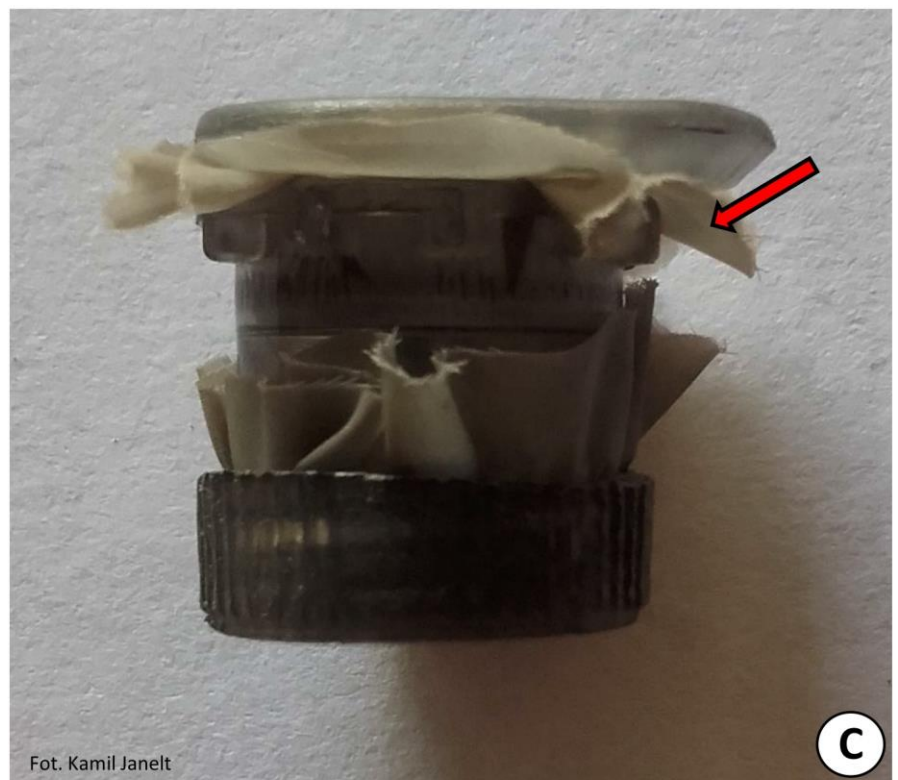
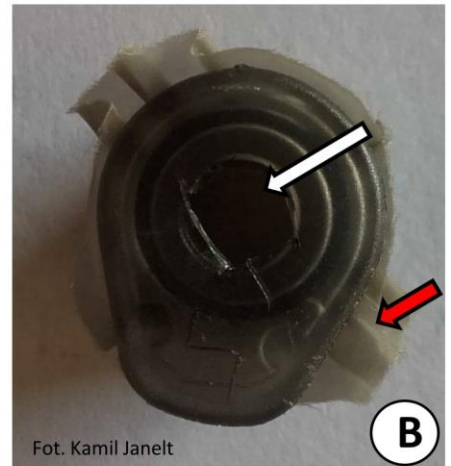
Fot. 1. Aparatura do tworzenia błon formwarowych.

A. 1 - gumowa gruszka do zasysania roztworu formwaru, 2 – szklana komora na szkiełko podstawowe, 3 – butelka z roztworem formwarem.

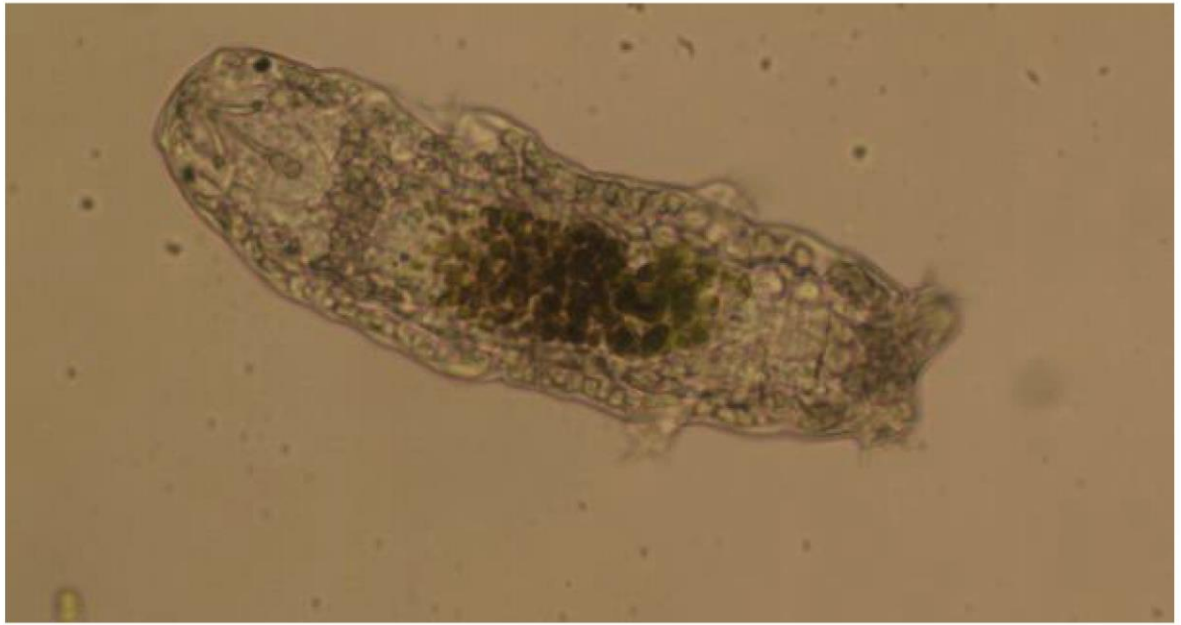
B. Komora z szkiełkiem podstawowym wypełniona roztworem formwaru; f – roztwór formwaru, strzałka – szkiełko podstawowe **C.** Siatki miedziane (strzałka) ułożone na błonie formwarowej.



Fot. 2. Naczynie do przygotowania materiału do SEM; biała strzałka – wieczko z otworem, czerwona strzałka – siatka limnologiczna;



Film 1. Dorosły osobnik *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018 -
widok od strony grzbietowej;



Film 2. *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018 - widok od strony brzusznej;

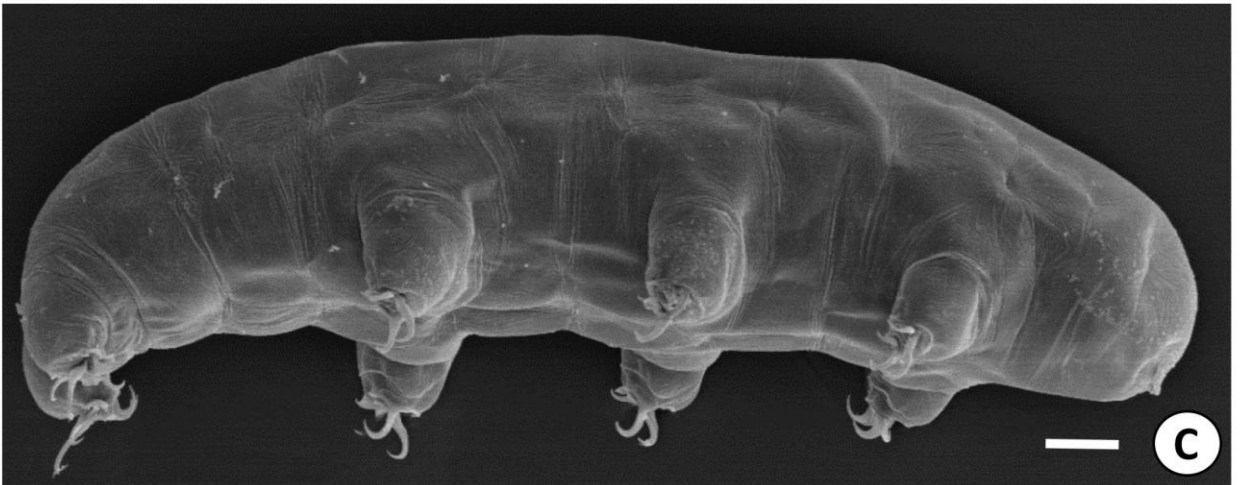
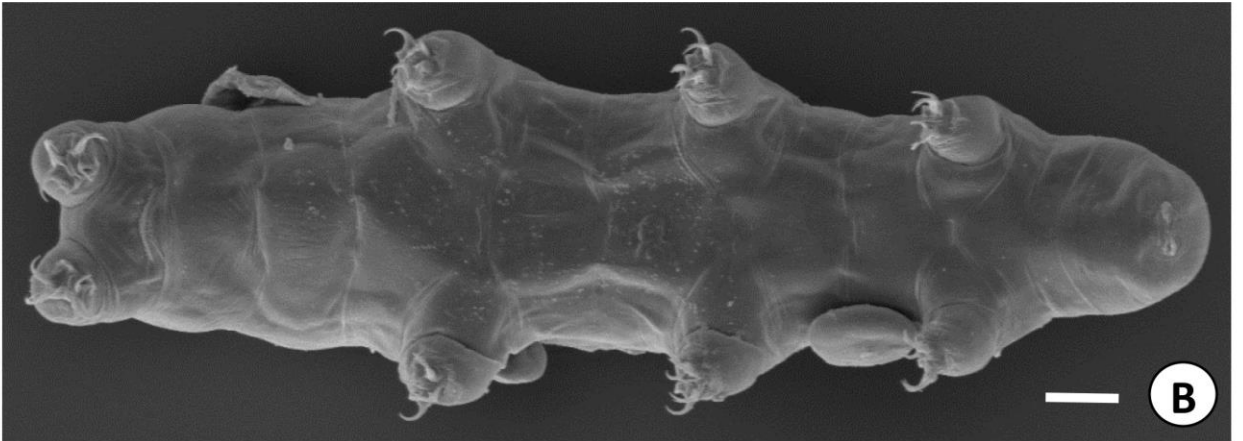
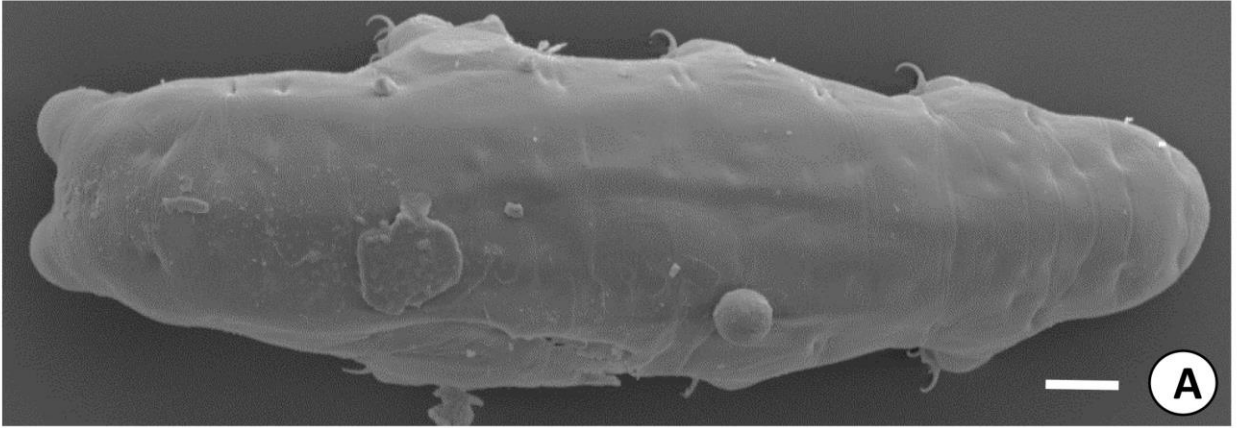


Fot. 3. Dorosłe osobniki *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk 2018 - pokrój ciała; SEM.

A. Widok od strony grzbietowej; skala = 6,02µm

B. Widok od strony brzusznej; skala = 13,5µm

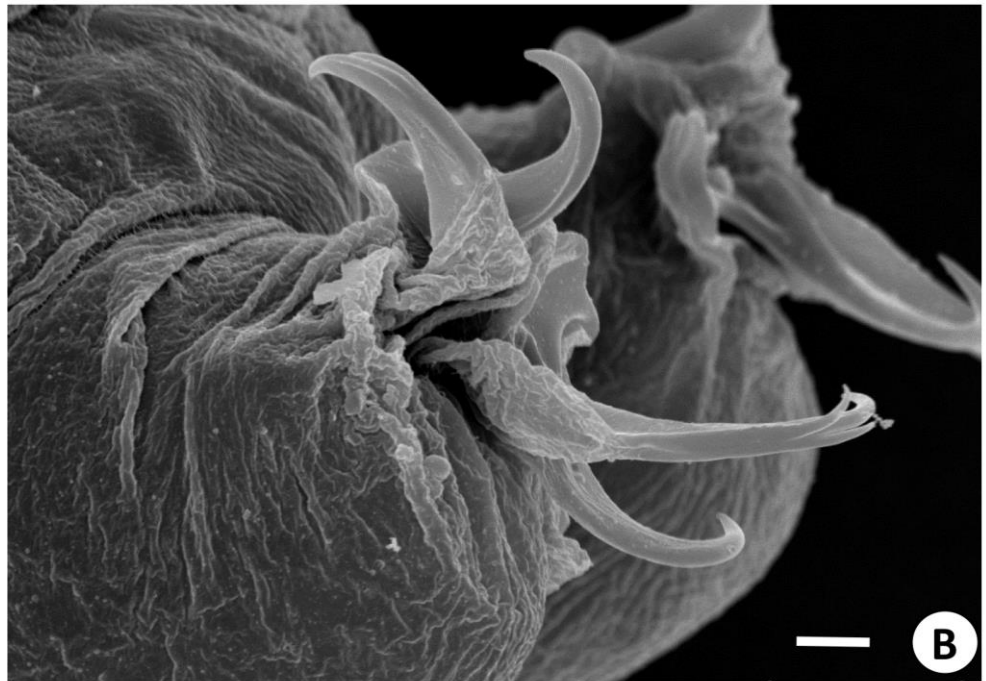
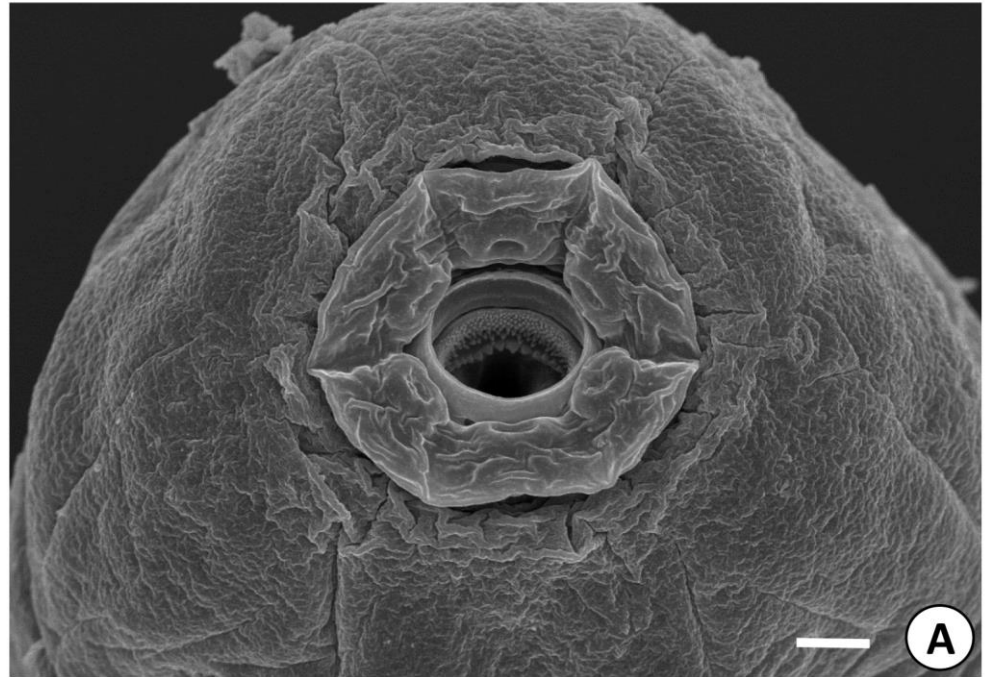
C. Widok od strony bocznej; skala = 26,83µm



Fot. 4. *Hypsibius exemplaris*; SEM.

A. Otwór gębowy; skala = 4,83 μm

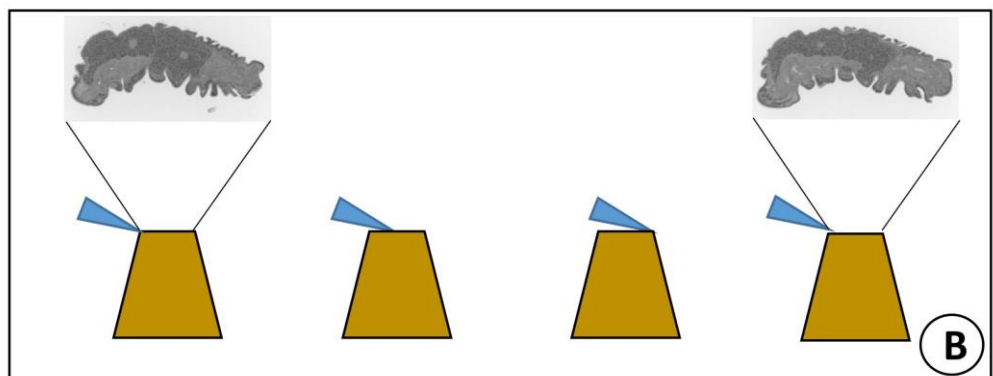
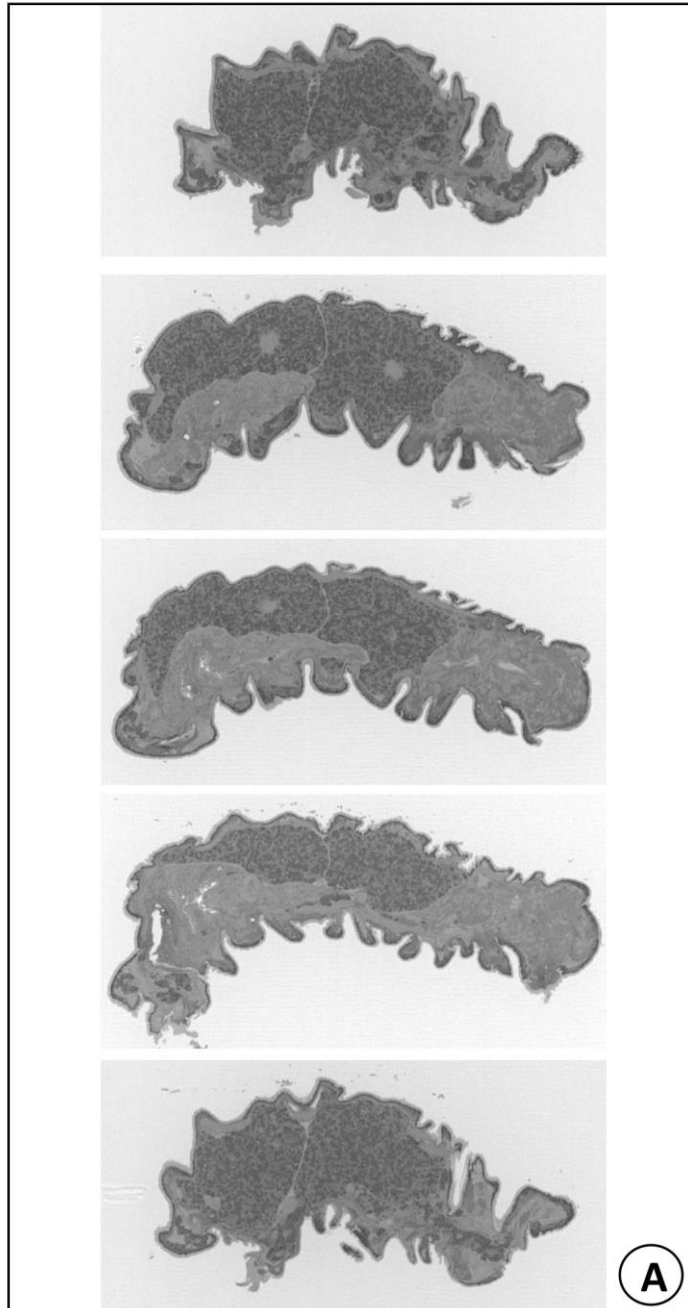
B. Odnóże zakończone pazurami; skala = 2,41 μm



Fot. 5. SBEM;

A. Wybrane skany powierzchni bloczka skrojone nożem diamentowym, zbierane w rozdzielczości 2048/2048px, uzyskane dzięki metodzie SBEM (seryjne skanowanie powierzchni bloczka);

B. Schemat uzyskiwania skanów powierzchni bloczka metodą SBEM;



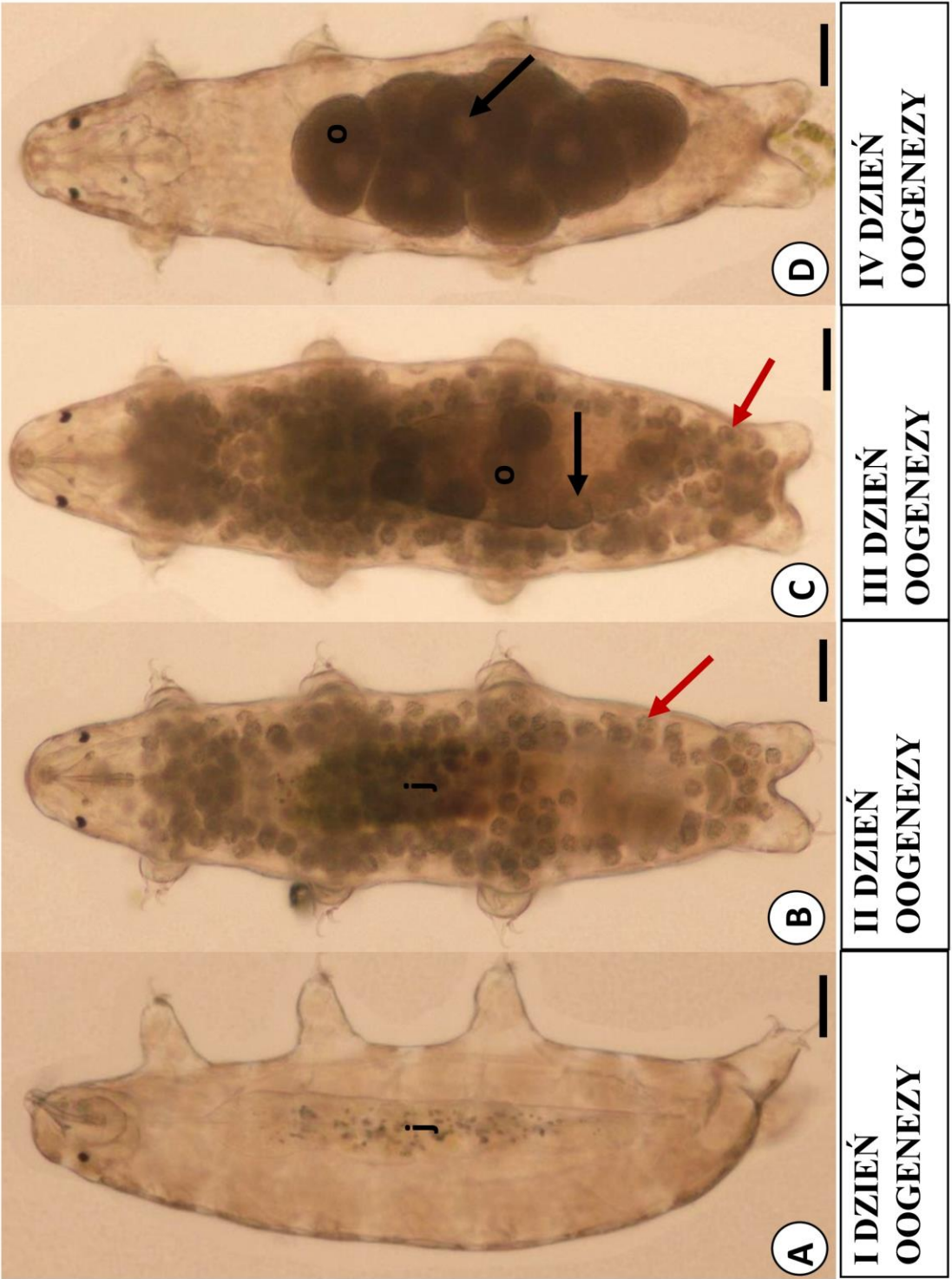
Fot. 6. *Hypsibius exemplaris* pokrój ogólny ciała na różnych stadiach oogenezy, widoczne (o) oocyty, (strzałka czarna) jądra oocytów, (strzałka bordowa) ciała spichrzowe, (j) jelito; mikroskop świetlny;

A. Pierwszy dzień oogenezy; skala = 2,5µm

B. Drugi dzień oogenezy; skala = 3,57µm

C. Trzeci dzień oogenezy; skala = 3,6µm

D. Czwarty dzień oogenezy; skala = 2,4µm



Fot. 7. *Hypsibius exemplaris* pokrój ogólny ciała: widoczne (**strzałka czarna**) wylinka, (**strzałka bordowa**) jaja, (**j**) jelito; (**gwiazdka**) samica składająca jaja; mikroskop świetlny kontrast nomarskiego;

A. Samica w trakcie owipozycji wewnątrz wylinki; skala = 2,3µm

B. Wylinka ze złożonymi jajami; skala = 2,7µm



**IV DZIEŃ
OOGENEZY
OWIPOZYCJA**

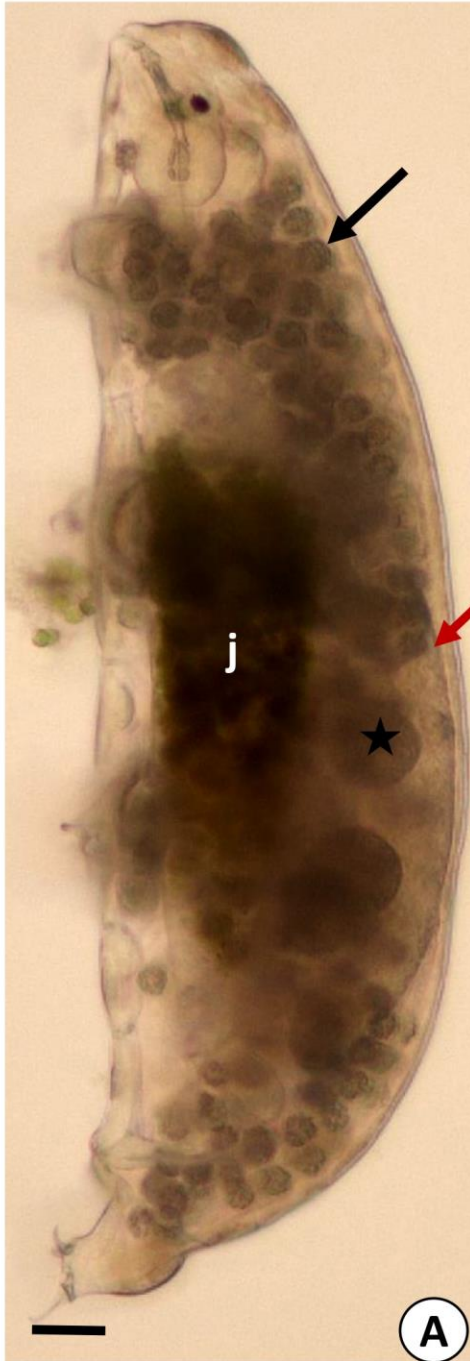


**WYLINKA
Z JAJAMI**

Fot. 8. *Hypsibius exemplaris* pokrój ogólny ciała: widoczne (**strzałka czarna**) ciałka spichrzowe, (**j**) jelito, (**strzałka bordowa**) ściana jajnika, (**gwiazdka**) oocyt; mikroskop świetlny;

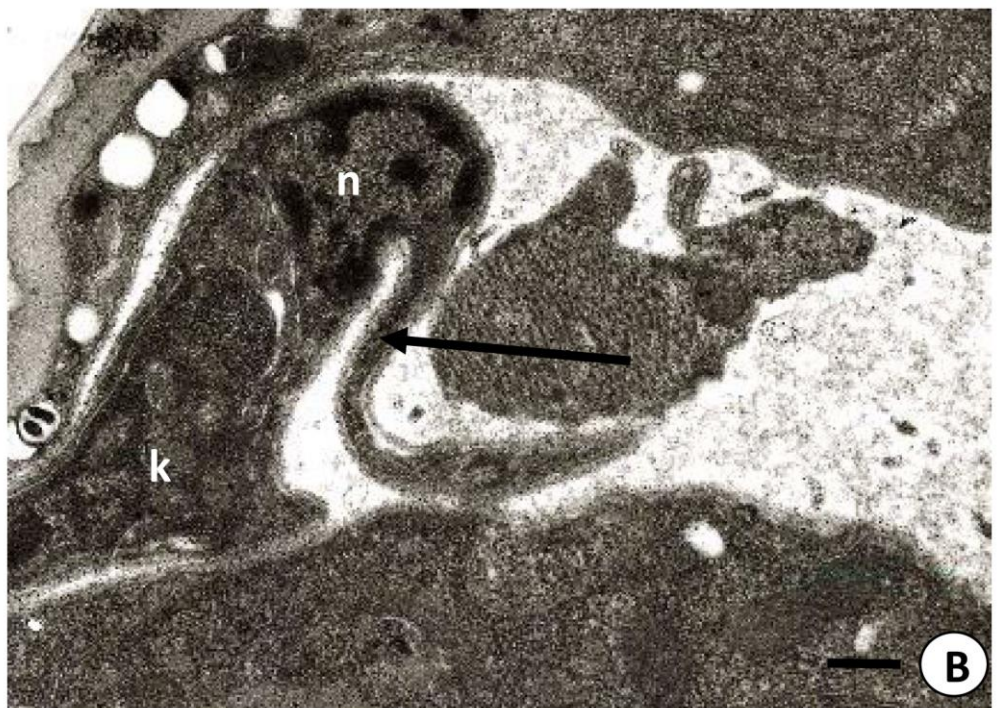
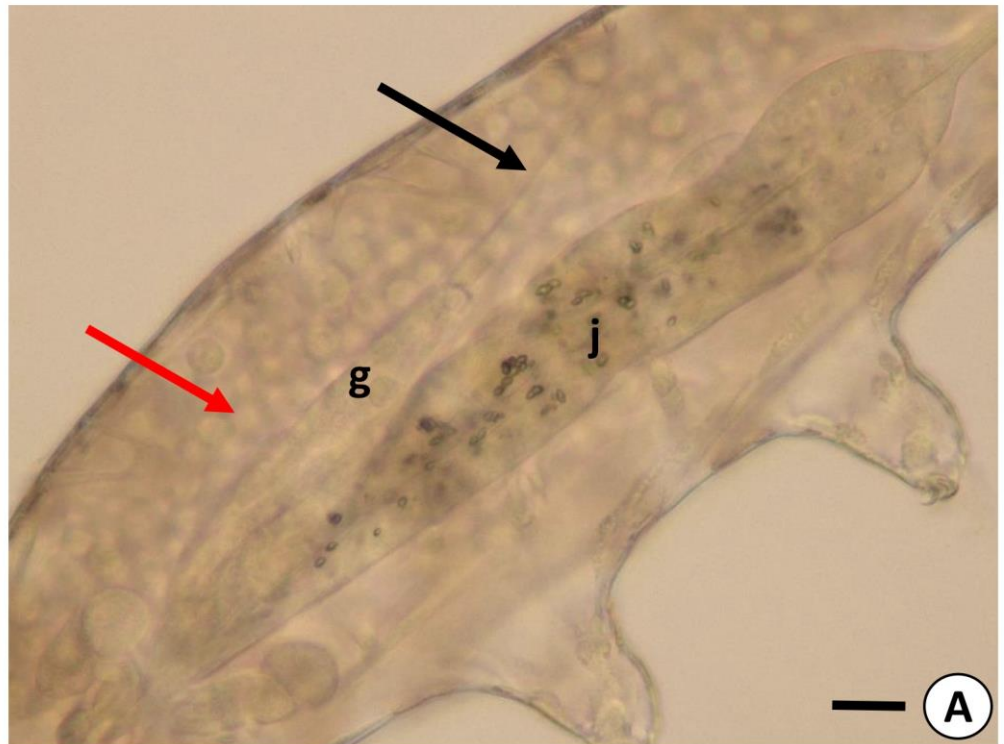
A. Widok od strony bocznej ciała; skala = 9μm

B. Widok od strony grzbietowej ciała; skala = 10,2μm

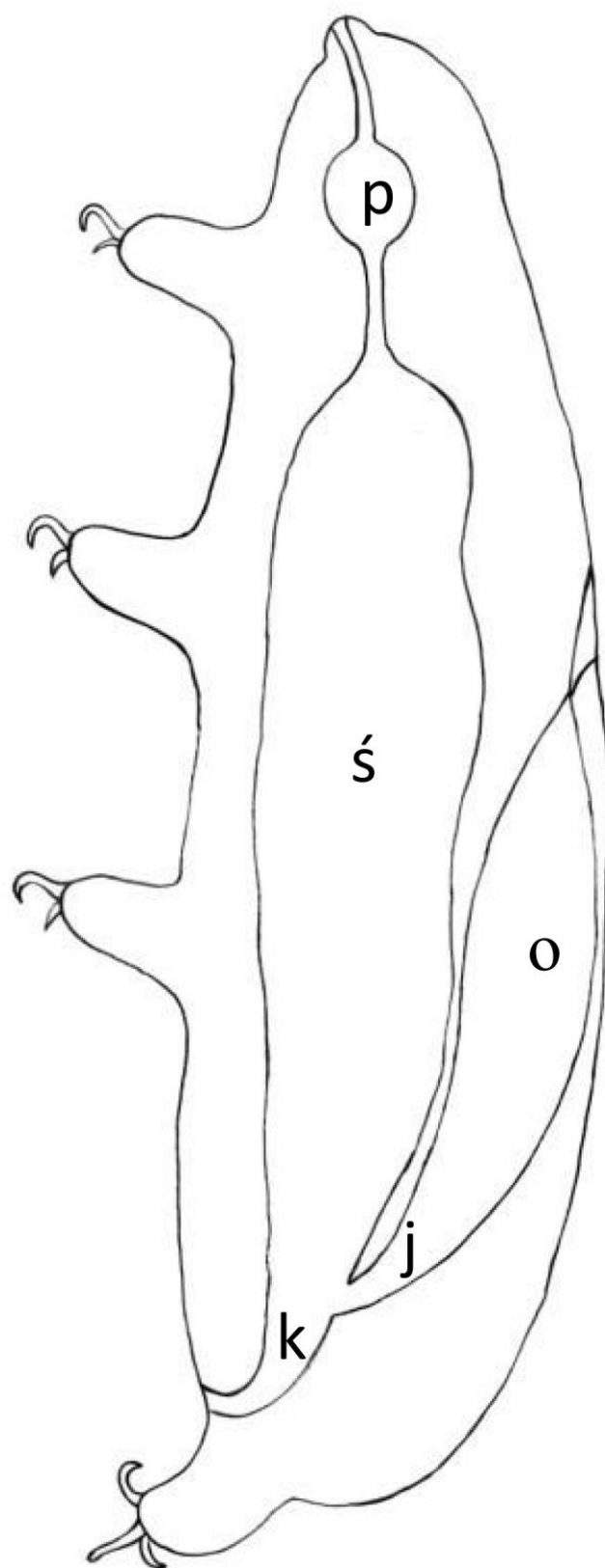


Fot. 9.

- A.** Fragment ciała *Hypsibius exemplaris* z widocznym jelitem, jajnikiem i filamentem terminalnym; (**czarna strzałka**) filmanet terminalny, (**g**) gonada żeńska, (**j**) jelito środkowe, (**czerwona strzałka**) ciała spichrzowe; mikroskop świetlny, skala = 8,9µm
- B.** Fragment jajnika *Hypsibius exemplaris* (**k**) komórka gonady żeńskiej, (**strzałka**) nić filamentu terminalnego, (**n**) jądro komórkowe komórki filamentu terminalnego; TEM, skala = 0,33µm



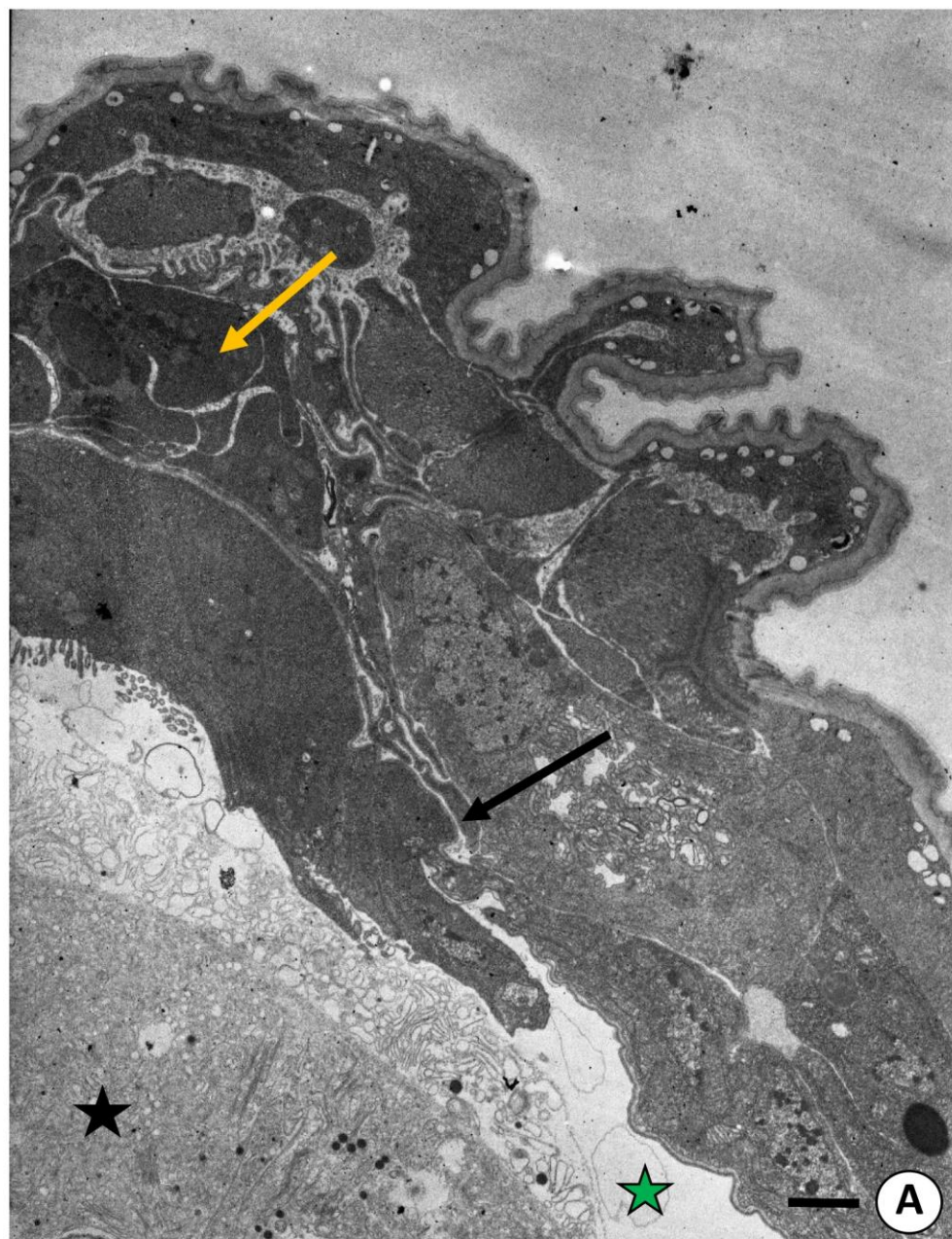
Fot. 10. Schemat budowy ciała niesporczaka; (**p**) jelito przednie, (**ś**) jelito środkowe, (**k**) kloaka, (**o**) jajnik, (**j**) jajowód.



A

Fot. 11. Ujście jajowodu do jelita tylnego u *Hypsibiusa exemplaris*; TEM.

A. (czarna gwiazdka) światło jelita środkowego, (zielona gwiazdka) światło jelita tylnego, (strzałka czarna) jajowód, (strzałka żółta) – jajnik; skala = 1,74µm

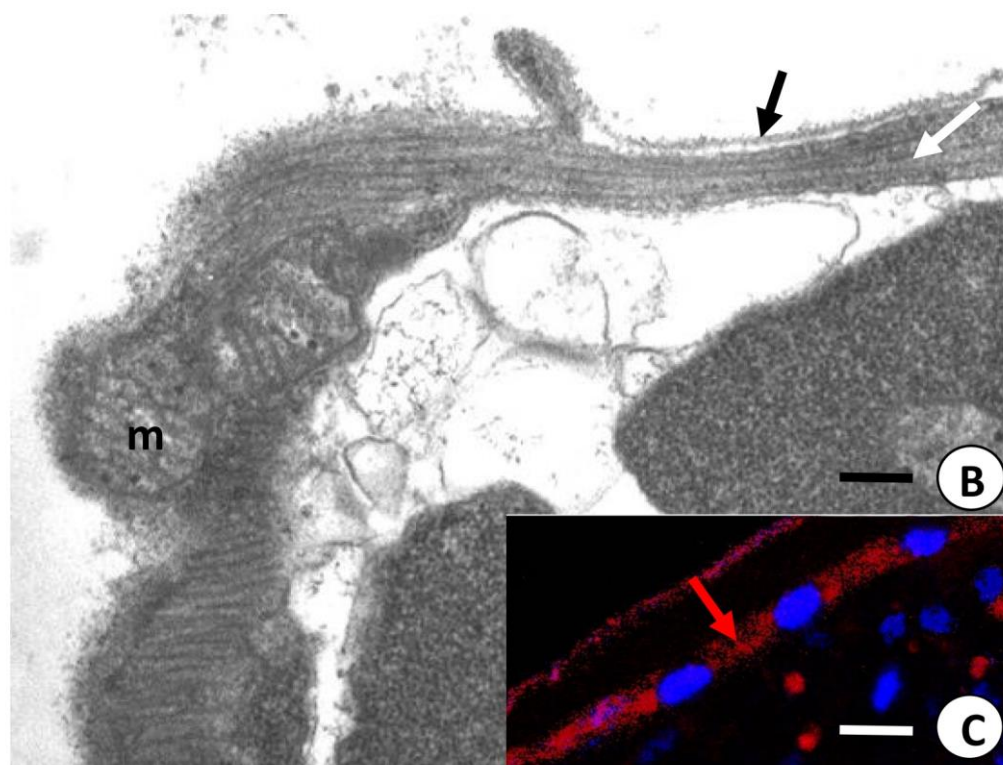
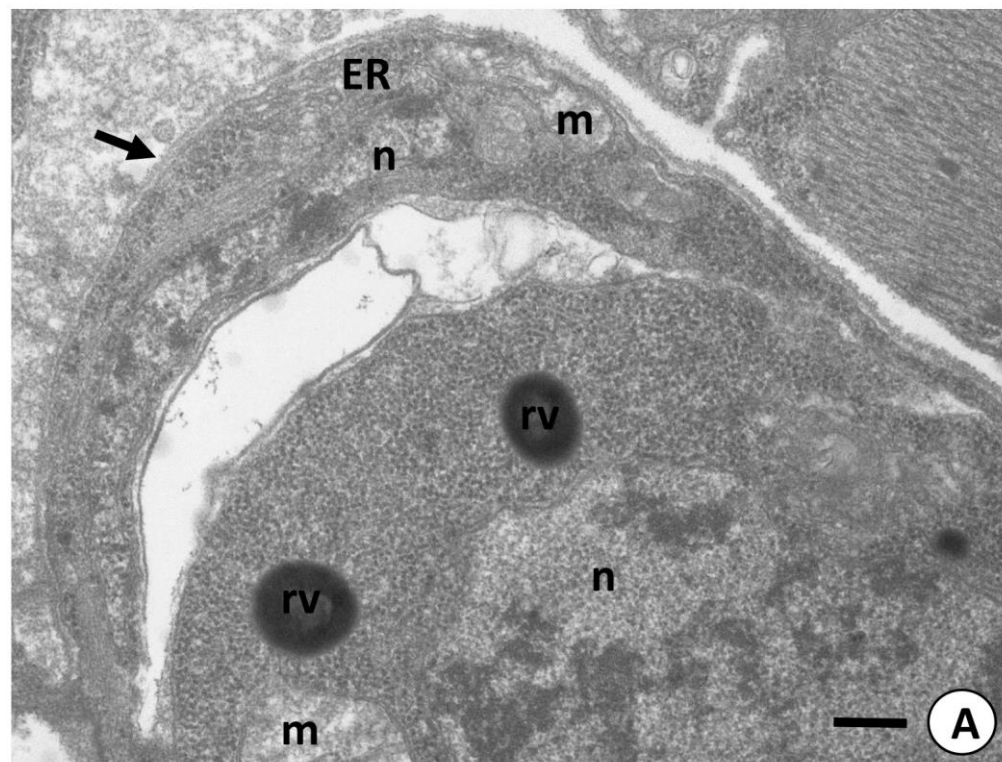


Fot. 12. Fragment ciała osobnika *Hypsibius exemplaris* z widocznym ujściem kloaki; SEM, skala = 23,78µm



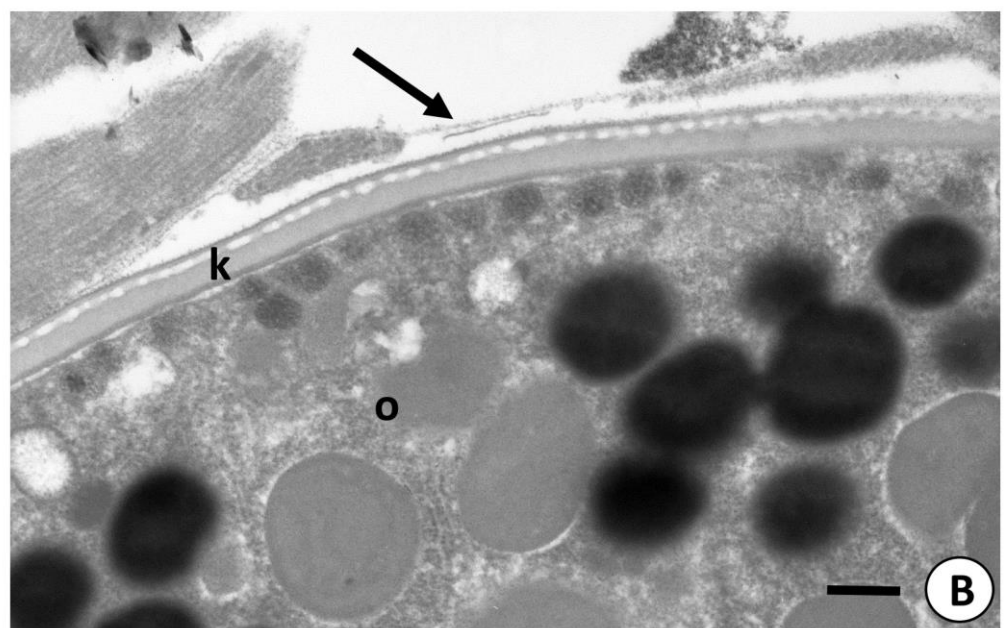
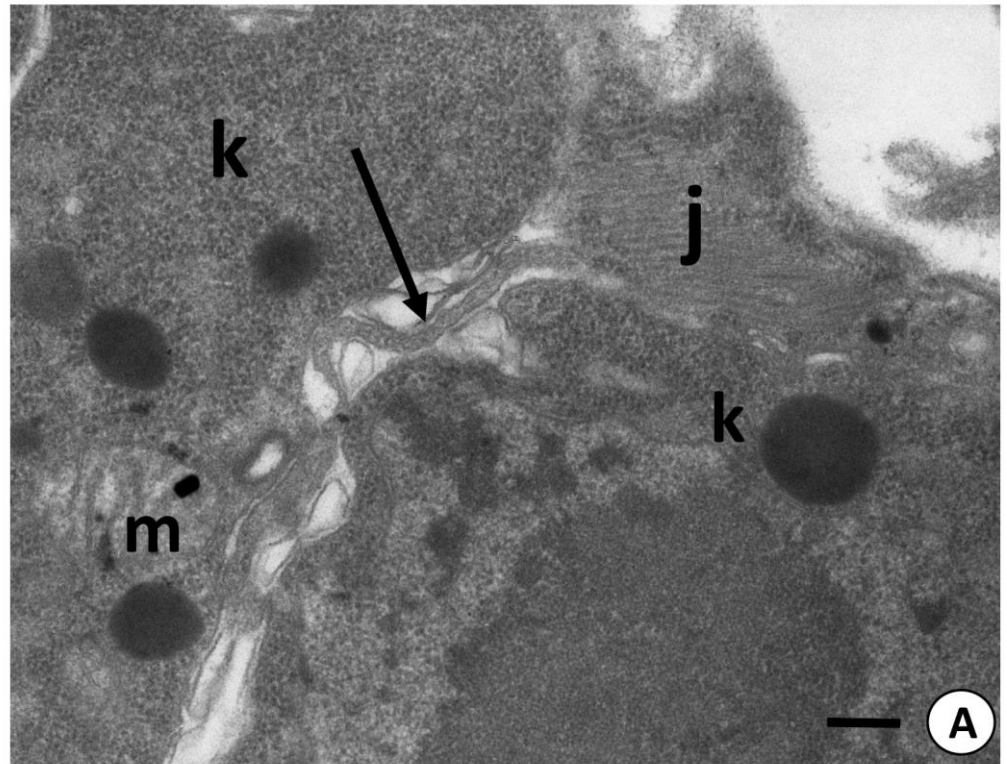
Fot. 13. Fragmenty gonady żeńskiej *H. exemplaris*.

- A.** Fragment ściany jajnika oraz fragment komórki linii płciowej; (**strzałka**) blaszka podstawna, (**ER**) siateczka śródplazmatyczna, (**m**) mitochondria, (**n**) jądro komórkowe, (**rv**) materiał zapasowy; TEM. skala = 0,37µm
- B.** Fragment ściany jajnika; (**strzałka czarna**) blaszka podstawna, (**strzałka biała**) cytoszkielet, (**m**) mitochondria; TEM. skala = 0,38µm
- C.** Fragment ściany jajnika z widocznym szkieletem aktynowym. (**czerwona strzałka**) szkielet aktynowy (czerwony kolor) (aktyna), jądra komórkowe (niebieski); rhodamina z falloidyną + DAPI, mikroskop konfokalny. skala = 6,9µm

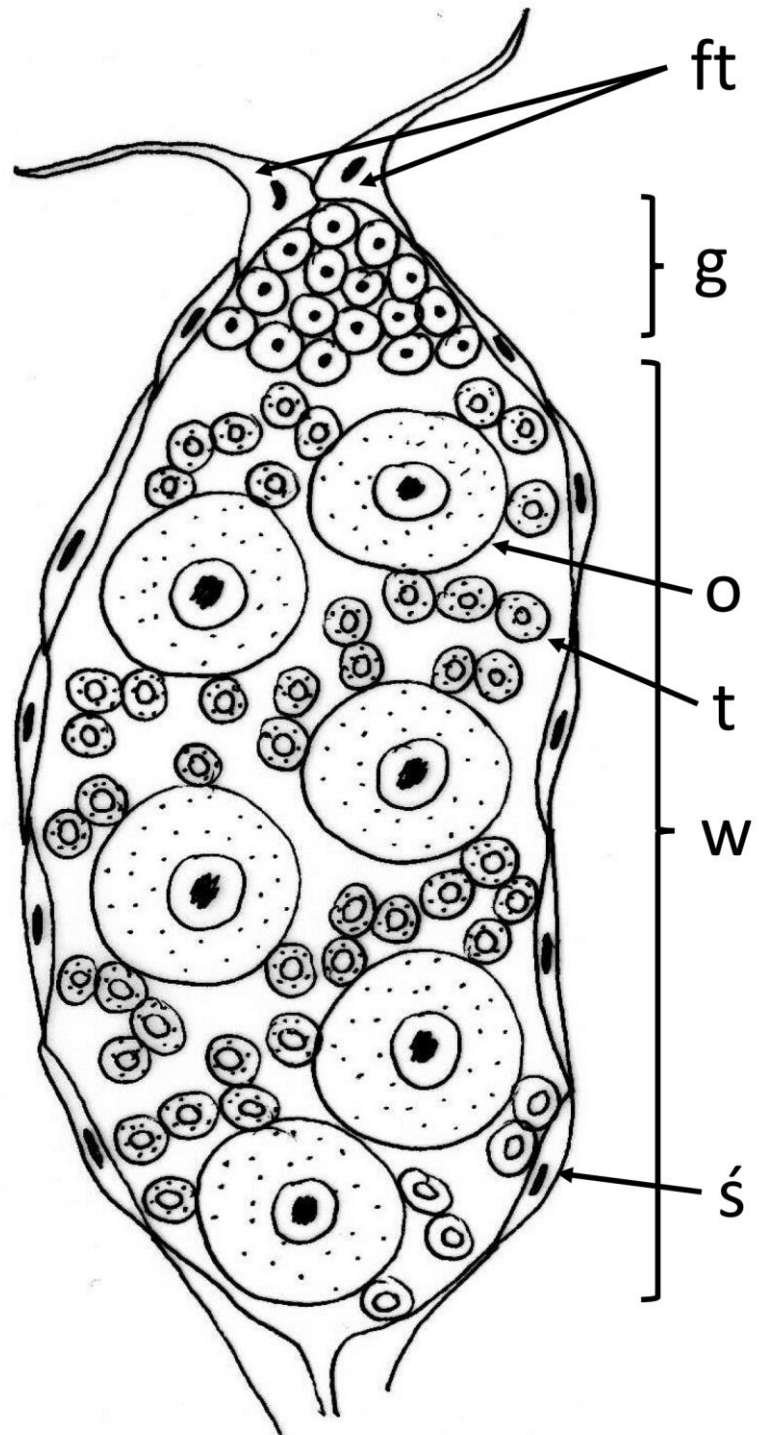


Fot. 14. Fragmenty gonady żeńskiej *H. exemplaris*.

- A.** Fragment ściany jajnika na etapie witelogenezy, widoczna wypustka ściany jajnika penetrująca do wnętrza gonady pomiędzy komórki płciowe; **(j)** ściana jajnika, **(k)** komórki płciowe wewnątrz gonady, **(m)** mitochondrium, **(strzałka)** wypustka ściany jajnika; TEM. skala = 0,28μm
- B.** Fragment silnie rozciągniętej ściany jajnika pod koniec choriogenezy. **(k)** kapsuła jajowa, **(strzałka)** ściana jajnika, **(o)** oocyt; TEM. skala = 0,44μm

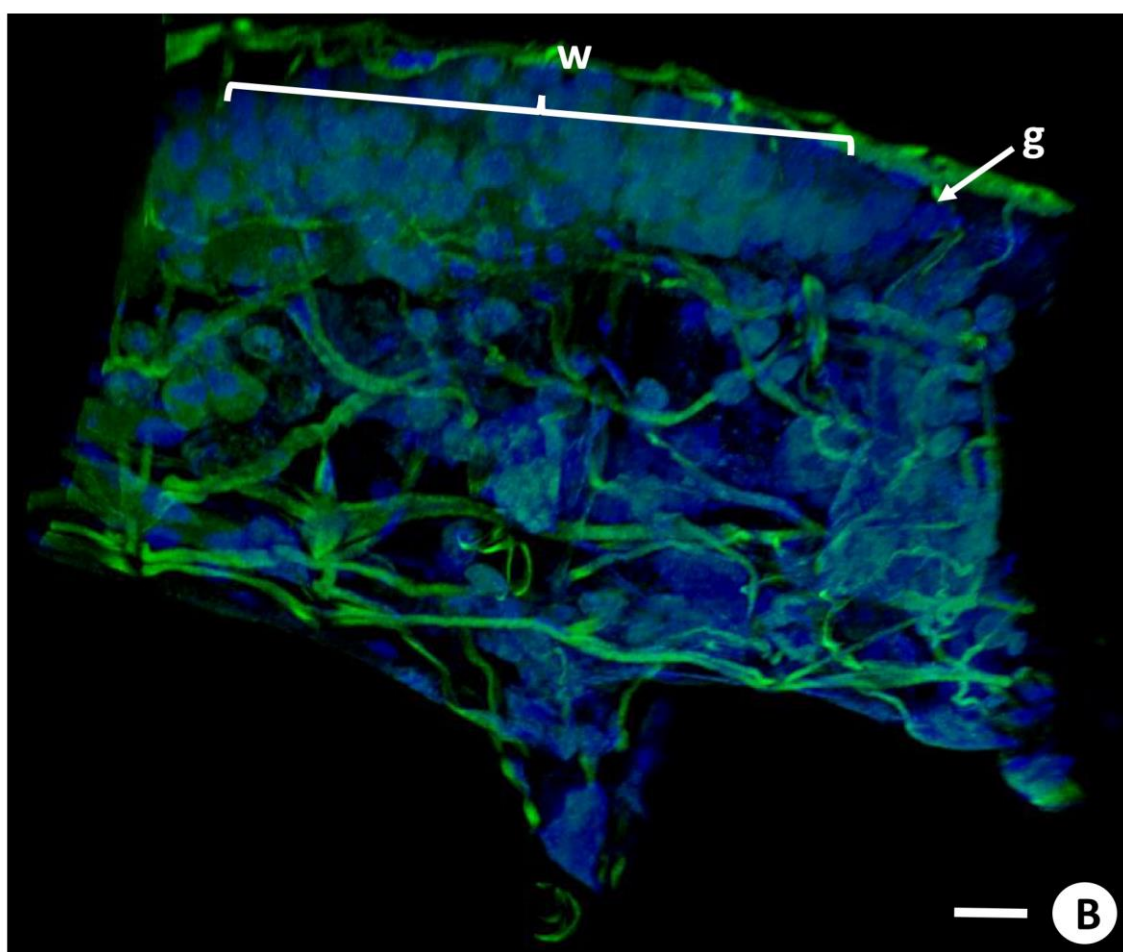
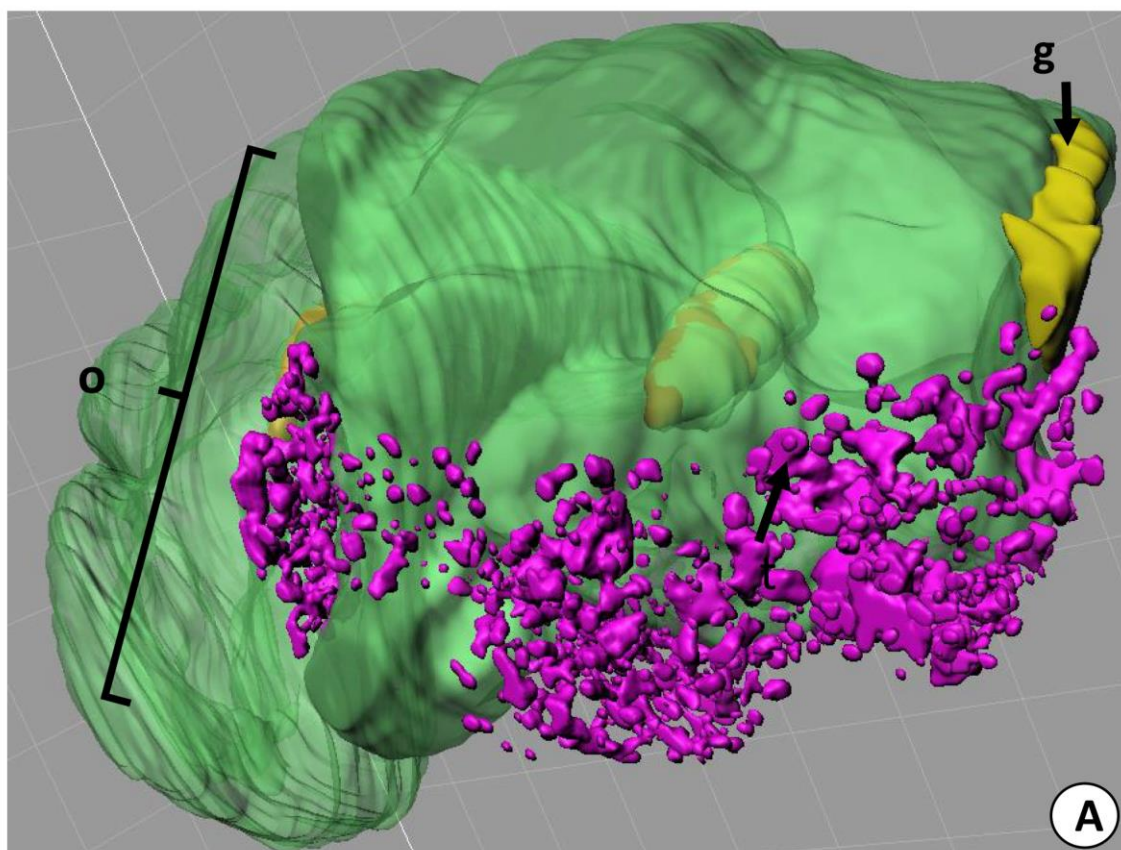


Fot. 15. Schemat organizacji jajnika *H. exemplaris*; (ft) dwie nici filamentu terminalnego, (g) germarium, (w) witelarium, (o) oocyt, (t) trofocyt, (ś) komórka ściany jajnika;



Fot. 16. Organizacja jajnika *H. exemplaris*.

- A.** Trójwymiarowa rekonstrukcja gonady uzyskana dzięki metodzie SBEM; (o) oocyt, (g) germarium;
- B.** Struktura jajnika; (g) germarium, (w) witelarium, niebieskie sygnały – jądra komórkowe, zielone sygnały – włókna mięśniowe; falloidyna Oregon Green + DAPI, mikroskop konfokalny; skala = 7,2µm

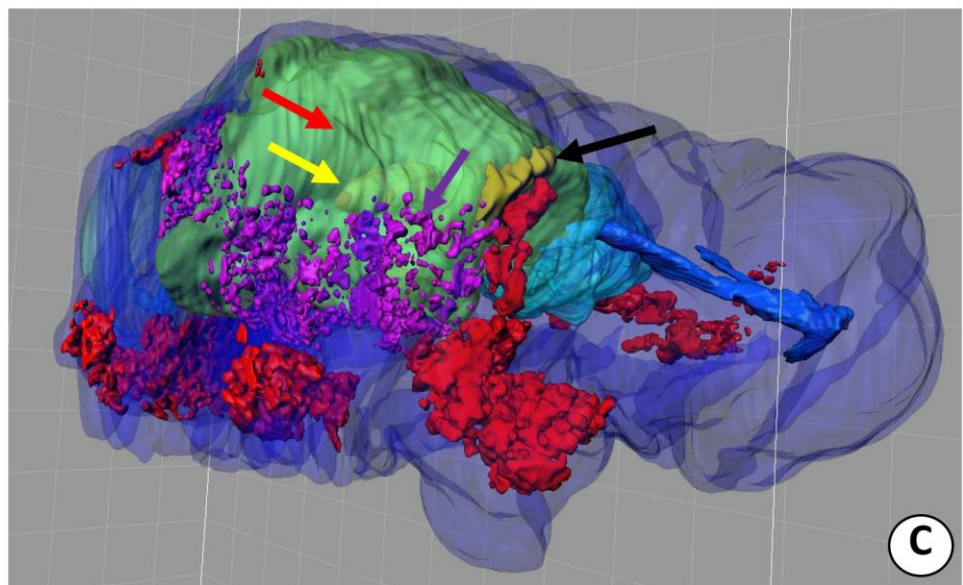
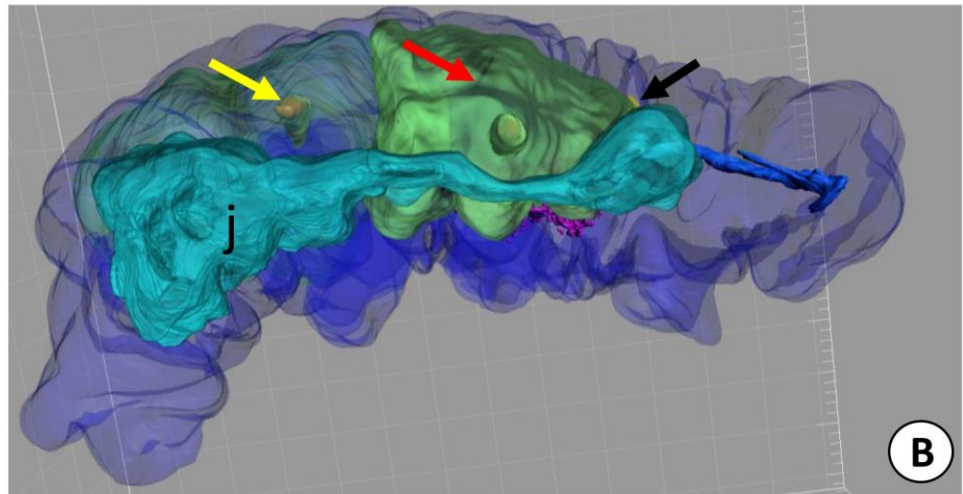
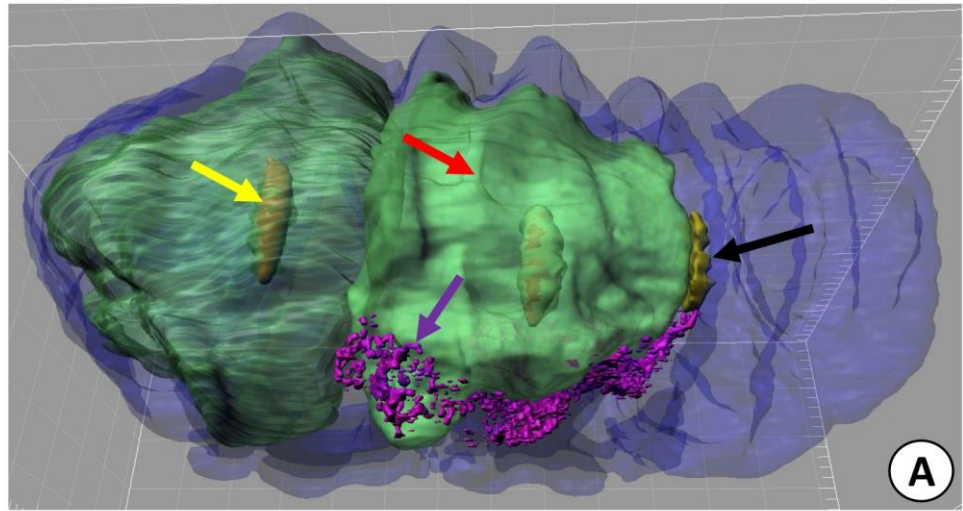


Fot. 17. Trójwymiarowe rekonstrukcje *H. exemplaris* uzyskane dzięki metodzie SBEM. (czarna strzałka; kolor żółty) germarium, (czerwona strzałka; kolor zielony) oocyt, (żółta strzałka) jądro oocytu, (fioletowa strzałka; fioletowy kolor) materiał zapasowy trofocytów;

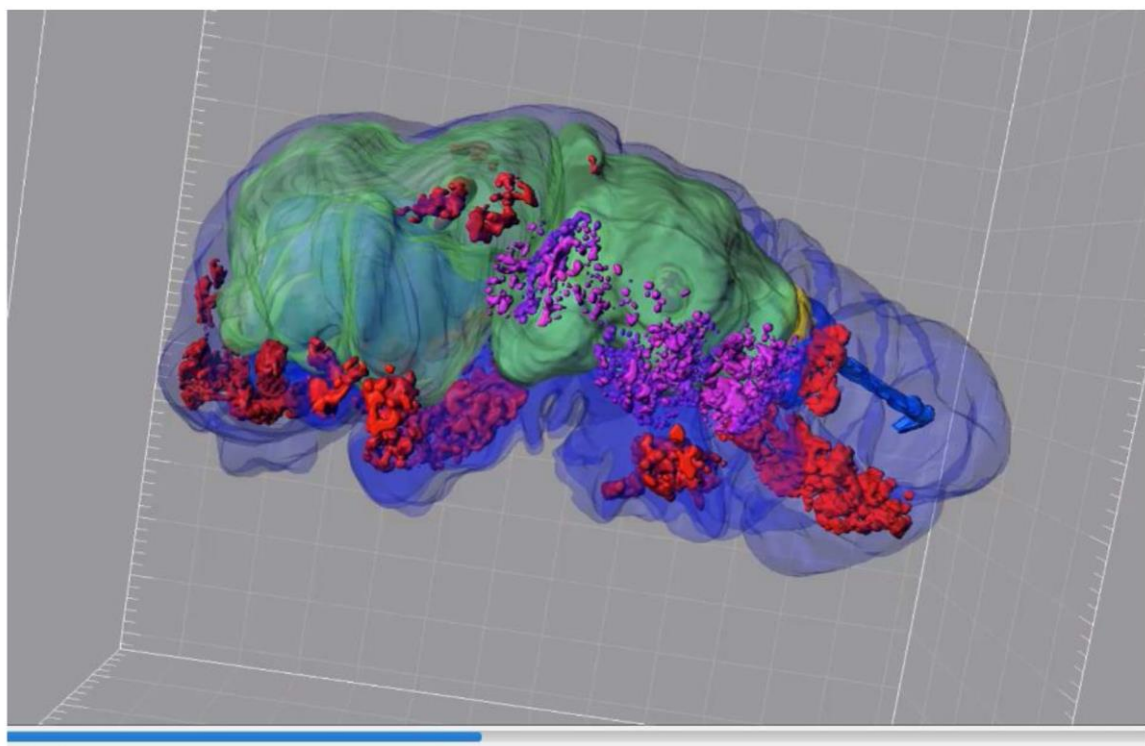
A. Widok od strony grzbietowej;

B. Widok od strony bocznej; (j) jelito;

C. Widok od strony głowy;

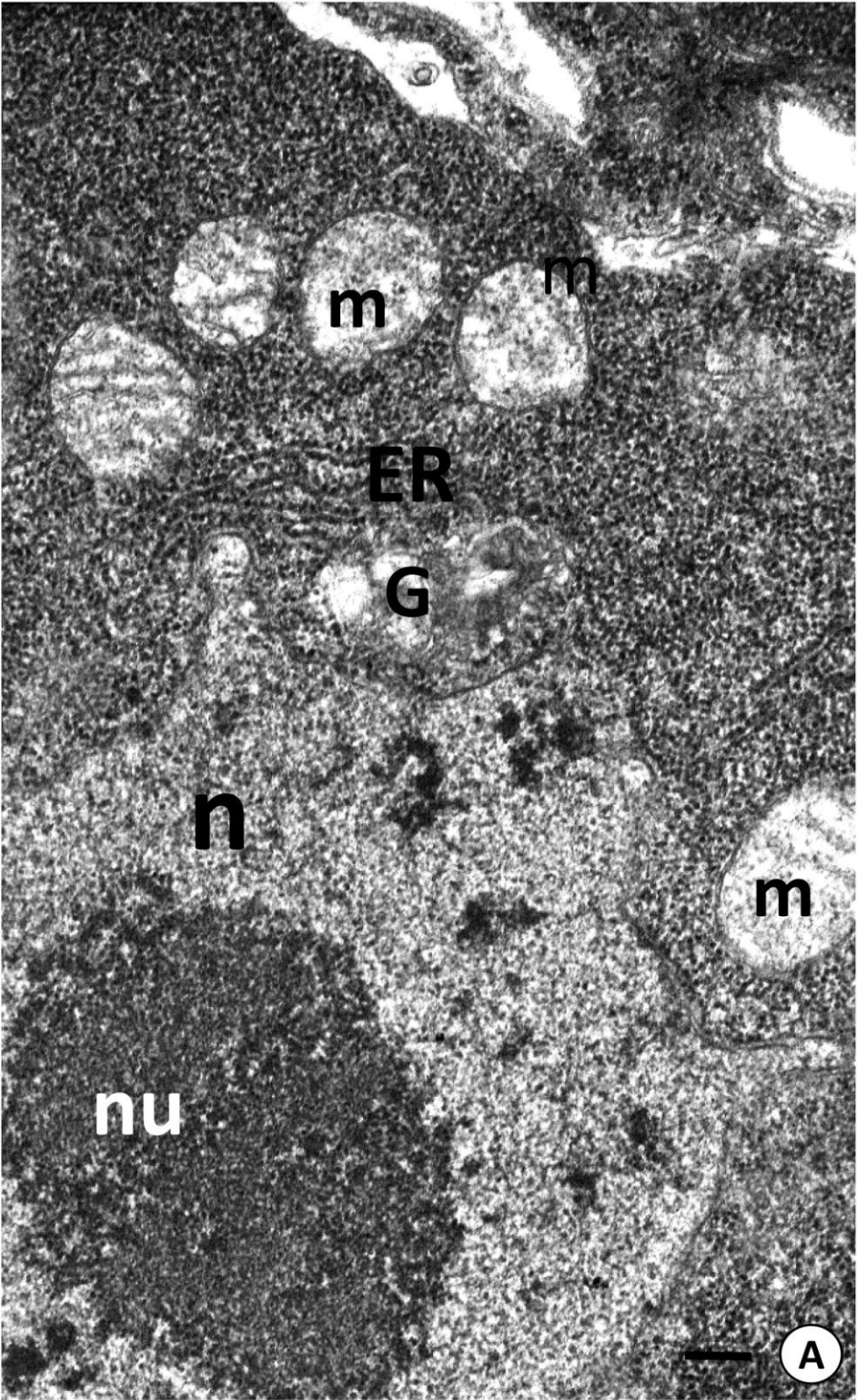


Film 3. Trójwymiarowa rekonstrukcja niesporczaka *Hypsibius exemplaris*. uzyskana dzięki metodzie SBEM, na filmie widoczne (**kolor żółty**) germarium, (**zielony**) oocyty, (**fioletowy**) materiał zapasowy trofocytów, (**czerwony**) materiał zapasowy ciałek spichrzowych;



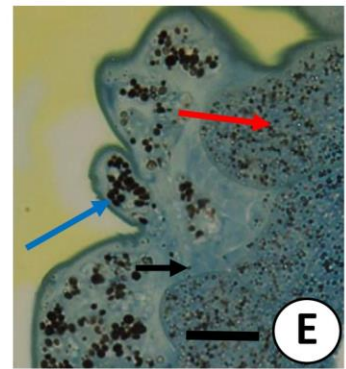
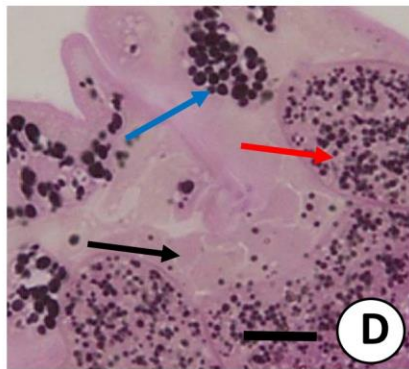
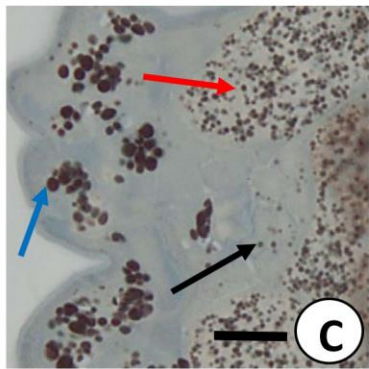
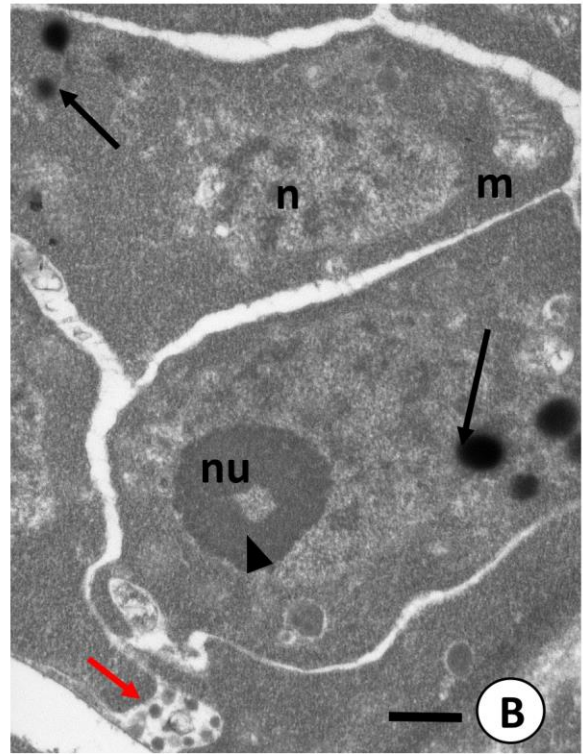
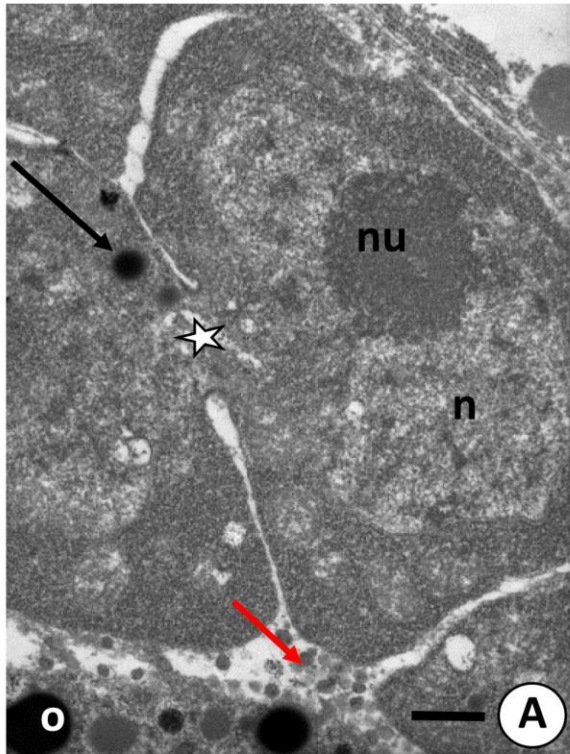
Fot. 18. Fragment komórki germarium *Hypsibiusa exemplaris*;

A. na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko komórkowe, **(m)** mitochondria, **(ER)** siateczka śródplazmatyczna, **(G)** aparat Golgiego; TEM. skala = 0,31 μm



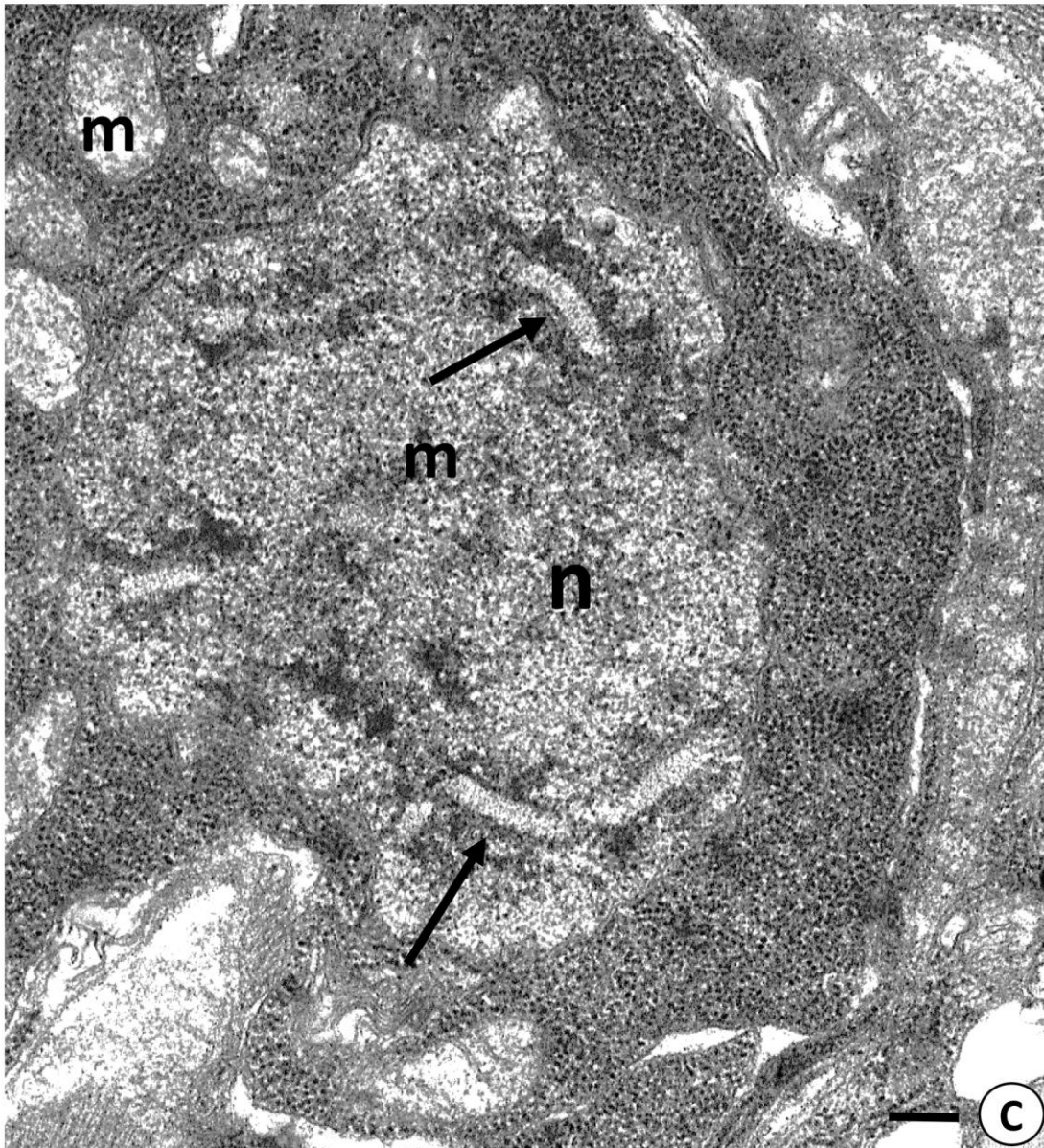
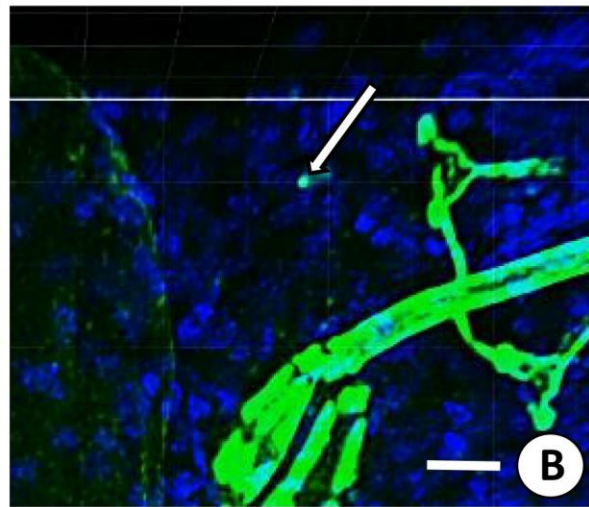
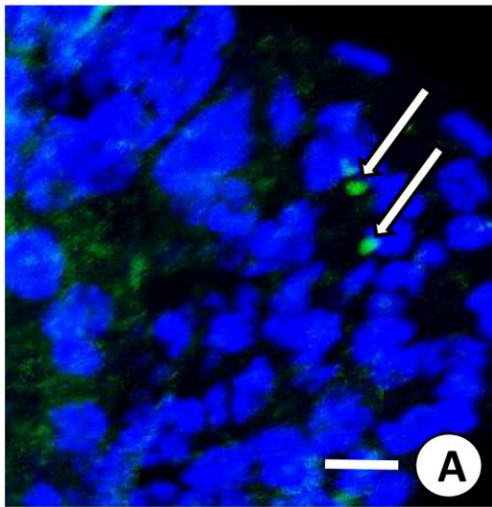
Fot. 19. Fragment młodego zespołu komórek płciowych *H. exemplaris* w części szczytowej witelarium oraz oocytu na zaawansowanym etapie oogenezy (choriogeneza);

- A.** na zdjęciu widoczne: **(o)** oocyt, **(nu)** jąderko komórkowe, **(n)** jądro komórkowe, **(czarna strzałka)** pierwsze kule materiałów zapasowych, **(czerwona strzałka)** materiał na chorion, **(gwiazdka)** mostek międzykomórkowy; TEM. skala = 0,67µm
- B.** na zdjęciu widoczne **(o)** oocyt, **(nu)** jąderko komórkowe, **(n)** jądro komórkowe, **(czarna strzałka)** pierwsze kule materiałów zapasowych, **(czerwona strzałka)** materiał na chorion, **(grot)** wakuola jąderkowa; TEM. skala = 0,83µm
- C.** Detekcja lipidów: **(czarna strzałka)** lipidy w komórkach młodego zespołu komórek płciowych, **(czerwona strzałka)** lipidy w cytoplazmie oocytu na etapie choriogenezy, **(niebieska strzałka)** lipidy w ciałkach spichrzowych; Sudan Czarny B, mikroskopia świetlna. skala = 0,89µm
- D.** Detekcja polisacharydów: **(czarna strzałka)** polisacharydy w komórkach młodego zespołu komórek płciowych, **(czerwona strzałka)** polisacharydy w cytoplazmie oocytu na etapie choriogenezy, **(niebieska strzałka)** polisacharydy w ciałkach spichrzowych; metoda PAS, mikroskopia świetlna. skala = 10,2µm
- E.** Detekcja ciał białkowych, **(czarna strzałka)** ciała białkowe w komórkach młodego zespołu komórek płciowych, **(czerwona strzałka)** ciała białkowe w cytoplazmie oocytu na etapie choriogenezy, **(niebieska strzałka)** ciała białkowe w ciałkach spichrzowych; metoda Bonhag'a, mikroskopia świetlna. skala = 7,2µm



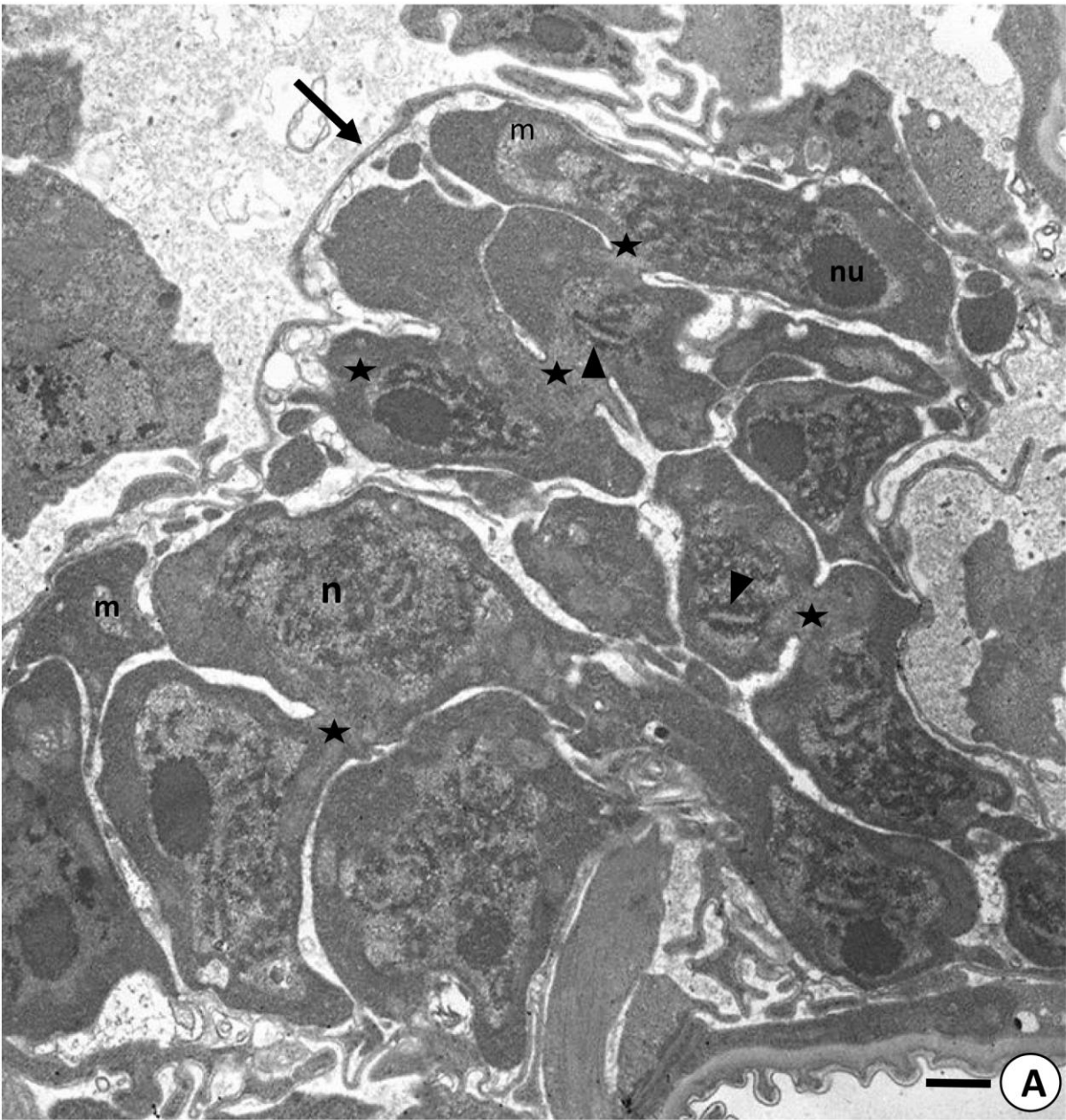
Fot. 20. Komórka linii płciowej *H. exemplaris* w trakcie podziału mitotycznego (A i B) oraz meiotycznego (C);

- A.** na zdjęciu uwidoczniona lokalizacja ufosforylowanej postaci histonu H3 – markera mitozy (zielony sygnał) (**strzałka**) + Hoechst 33342; mikroskop konfokalny; skala = 14,6µm
- B.** na zdjęciu uwidoczniona lokalizacja ufosforylowanej postaci histonu H3 – markera mitozy (zielony sygnał) (**strzałka**) + Hoechst 33342; mikroskop konfokalny; skala = 5,4µm
- C.** na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe, (**m**) mitochondrium, (**strzałka**) kompleksy synaptonemalne; TEM; skala = 0,25µm



Fot. 21. Tworzący się zespół komórek płciowych *H. exemplaris*;

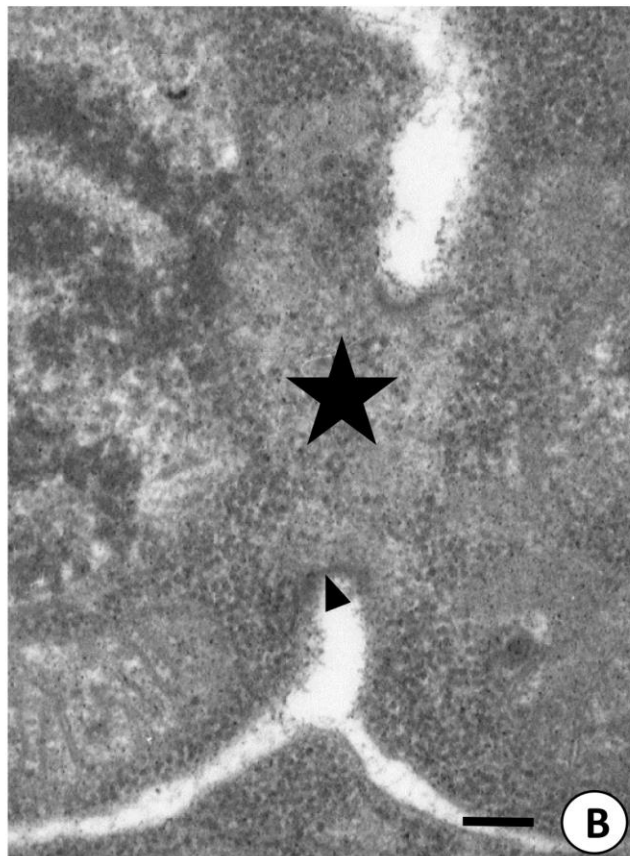
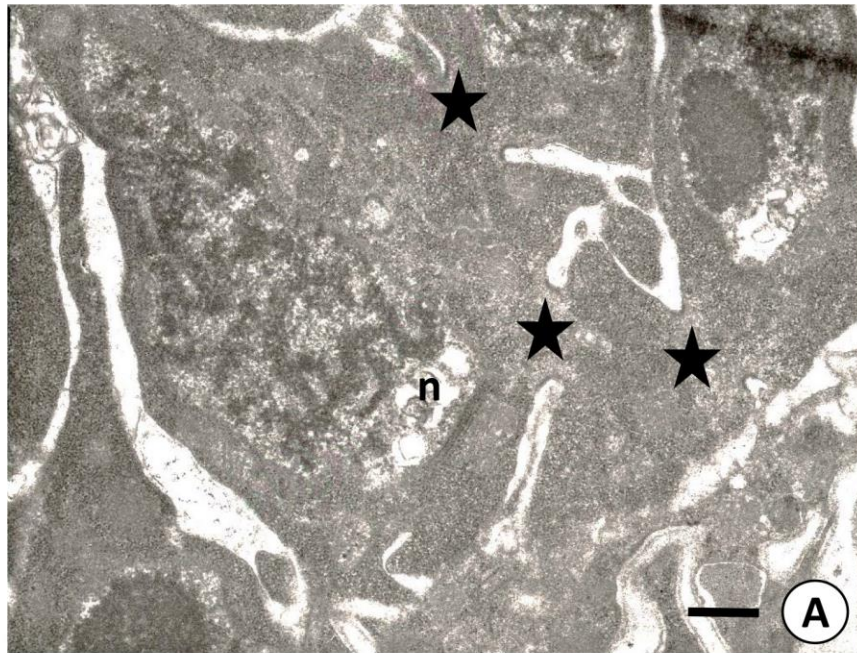
A. na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(gwiazdka)** mostek międzykomórkowy, **(grot)** kompleks synaptonemalny, **(strzałka)** ściana jajnika; TEM; skala = 1,25µm



Fot. 22. Tworzący się zespół komórek płciowych *H. exemplaris*; komórki połączone mostkami międzykomórkowymi;

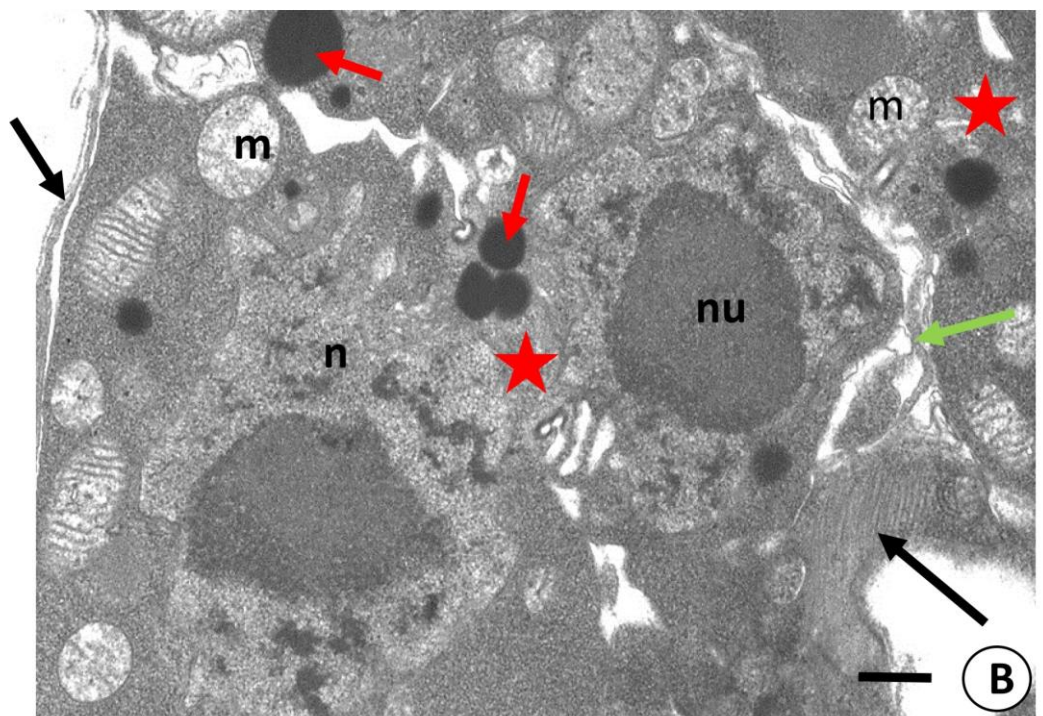
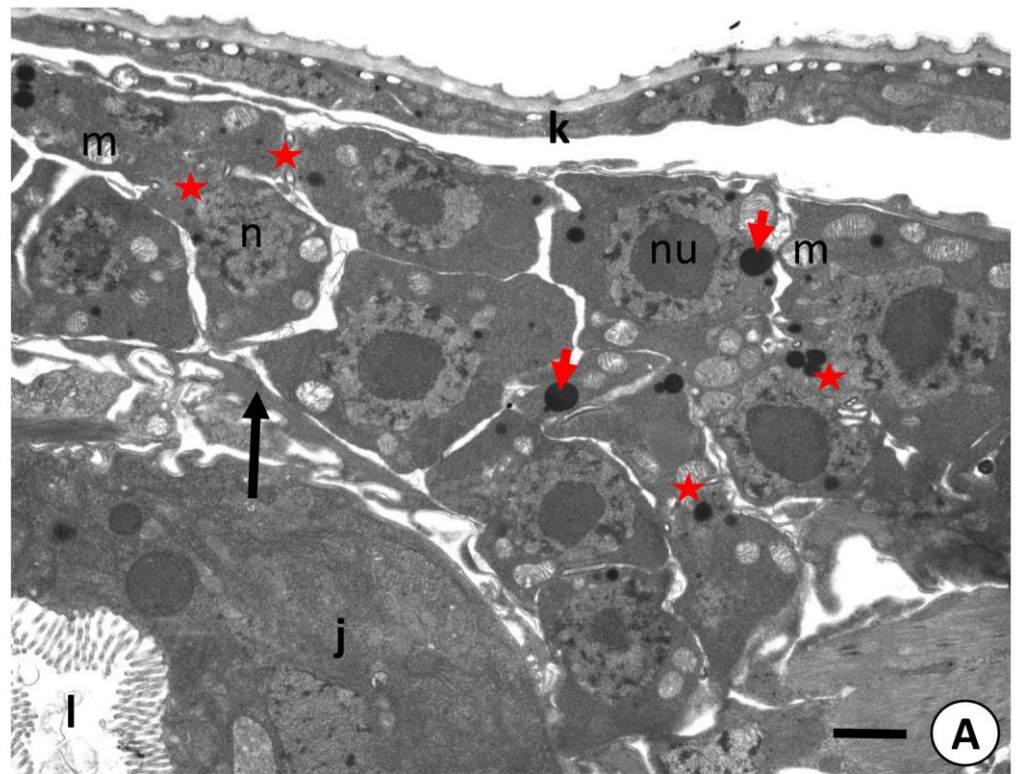
A. na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe, (**gwiazdka**) mostek międzykomórkowy; TEM; skala = 0,83 μ m

B. na zdjęciu widoczny (**gwiazdka**) mostek międzykomórkowy oraz (**grot**) okładzina mostka; TEM; skala = 0,3 μ m



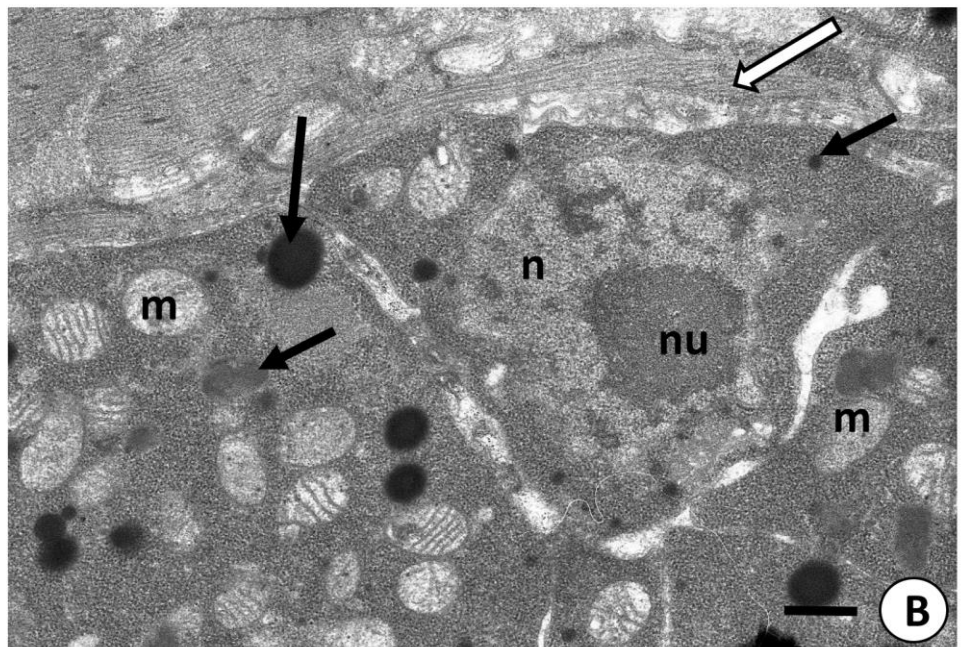
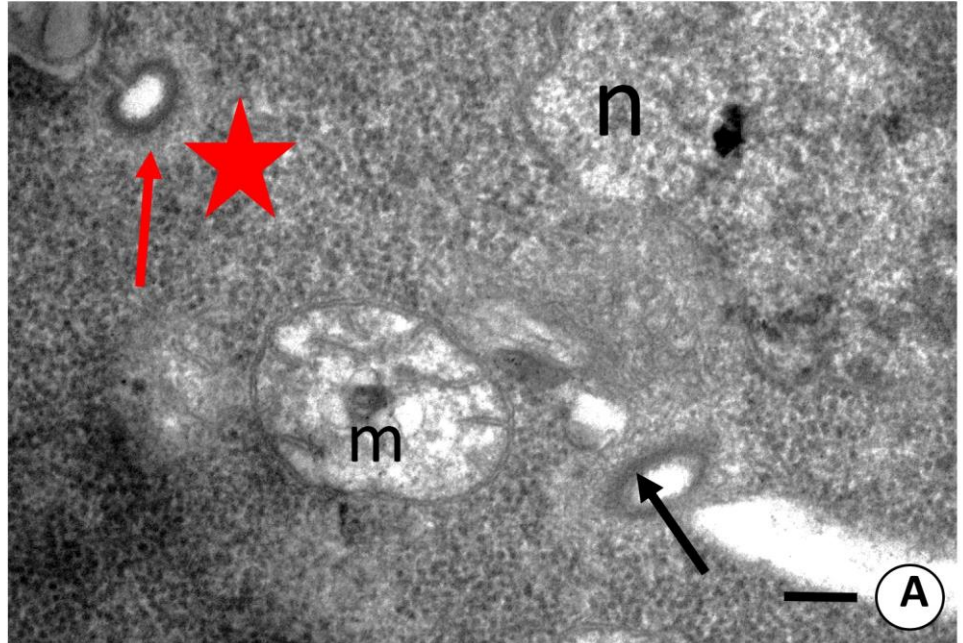
Fot. 23. Fragment jajnika z zespołami komórek płciowych w witelarium oraz fragment jelita środkowego *H. exemplaris*;

- A.** na zdjęciu widoczne **(l)** światło jelita środkowego, **(j)** nabłonek jelita środkowego, **(czarna strzałka)** ściana jajnika, **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(m)** mitochondrium, **(czerwona strzałka)** materiał zapasowy, **(czerwona gwiazdka)** stabilny mostek międzykomórkowy, **(k)** kutikula; TEM; skala = 1,94μm
- B.** Komórki zespołu komórek płciowych połączone stabilnym mostkiem międzykomórkowym; na zdjęciu widoczne **(czarna strzałka)** ściana jajnika, **(zielona strzałka)** wypustka ściany jajnika penetrująca do wnętrza jajnika, **(nu)** jąderko, **(n)** jądro komórkowe, **(czerwona gwiazdka)** mostek międzykomórkowy, **(m)** mitochondrium, **(czerwona strzałka)** materiał zapasowy; TEM. skala = 0,53μm



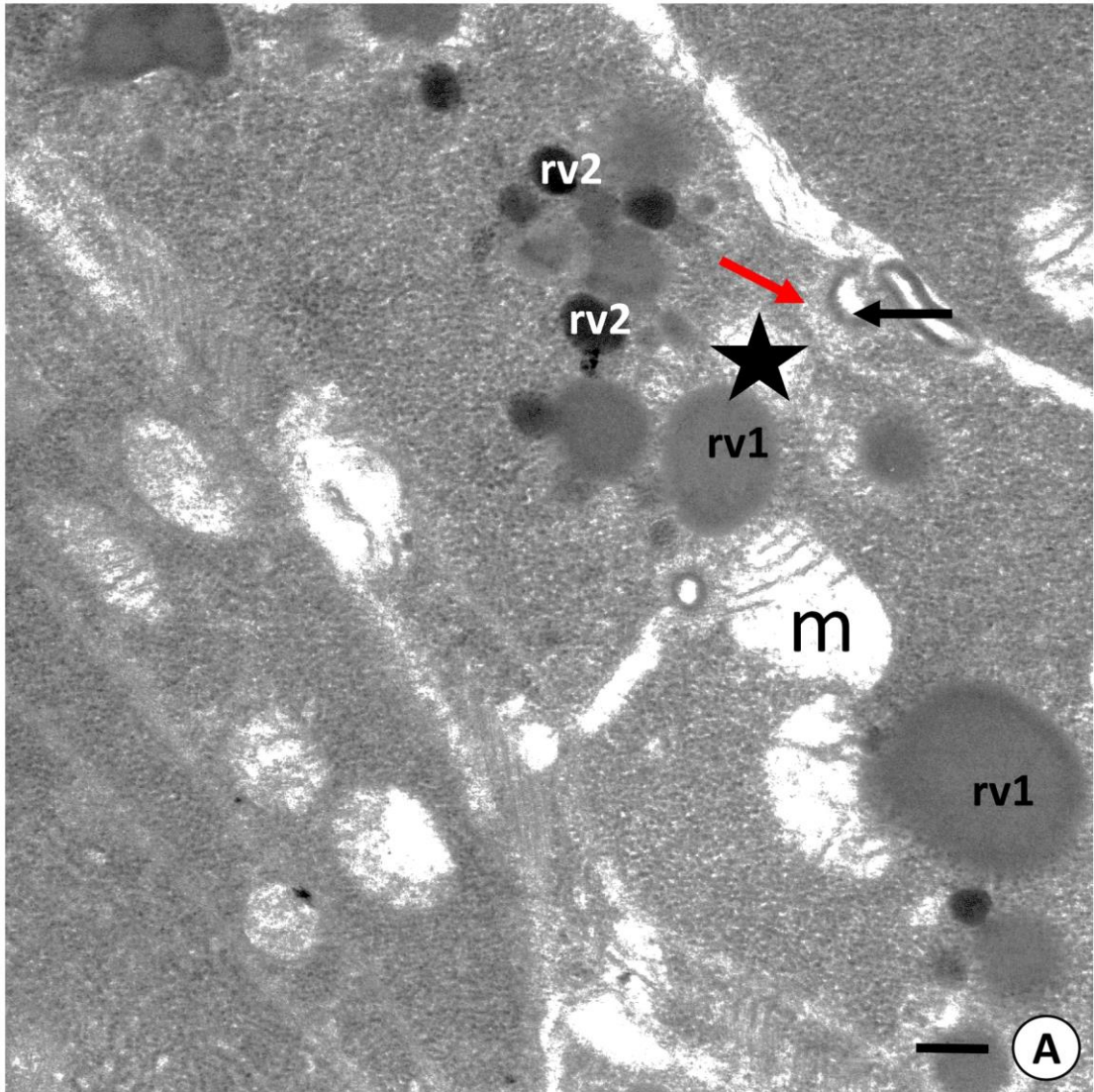
Fot. 24. Fragment zespołu komórek płciowych *H. exemplaris*;

- A.** Organella komórkowe na terenie stabilnego mostka międzykomórkowego, na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe; (**m**) mitochondrium, (**czzerwona gwiazdka**) stabilny mostek międzykomórkowy, (**czzerwona strzałka**) okładzina wewnętrzna mostka międzykomórkowego, (**czarna strzałka**) okładzina zewnętrzna mostka międzykomórkowego; TEM. skala = 0,22 μ m
- B.** Komórki zespołu komórek płciowych na etapie witelogenezy, na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe, (**nu**) jąderko, (**m**) mitochondrium, (**czarna strzałka**) materiał zapasowy, (**biała strzałka**) ściana jajnika; TEM. skala = 2,53 μ m



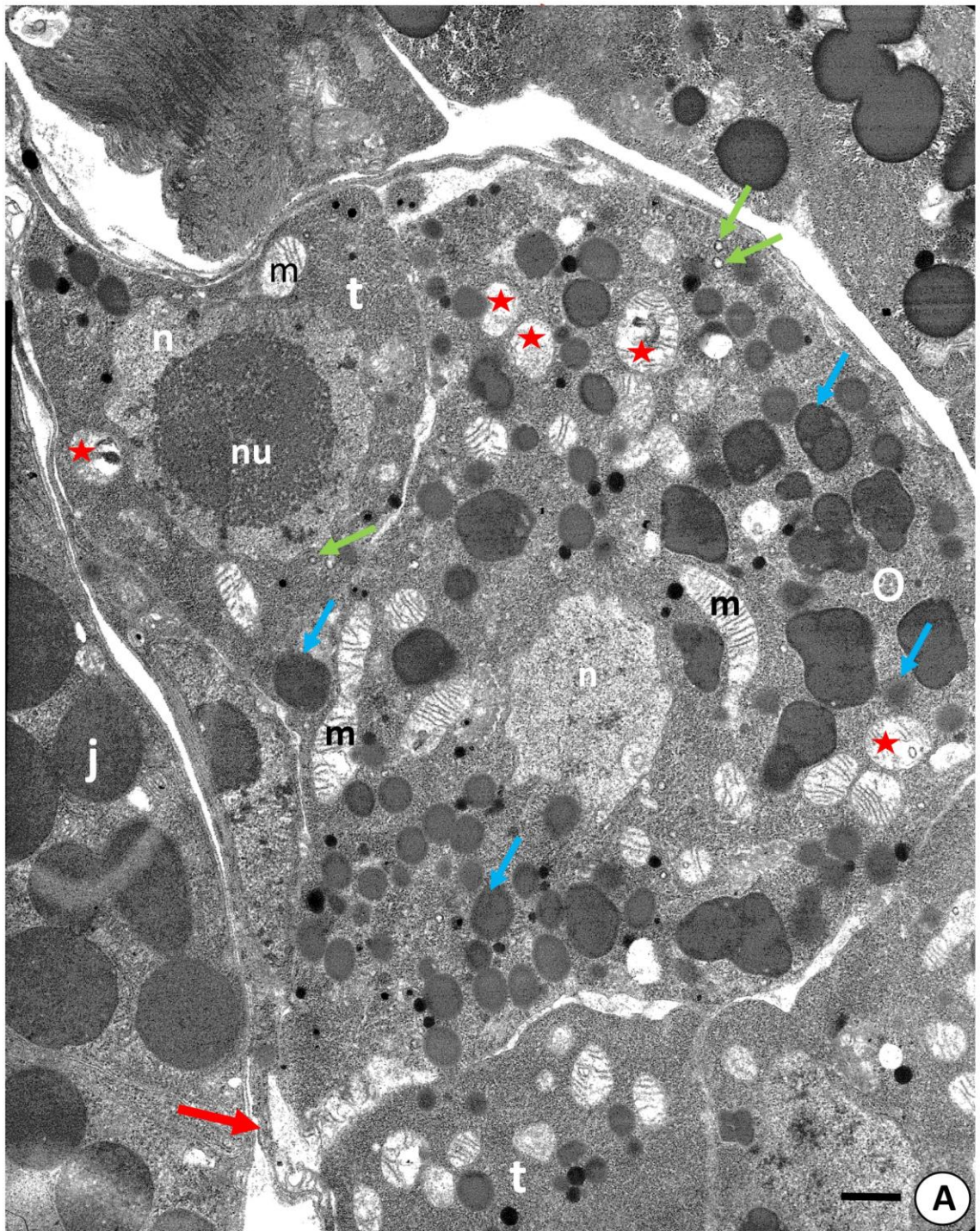
Fot. 25. Organella komórkowe i materiał zapasowy na terenie stabilnego mostka międzykomórkowego komórek płciowych na etapie środkowej witelogenezy;

A. Na zdjęciu widoczne **(m)** mitochondrium, **(gwiazdka)** stabilny mostek międzykomórkowy, **(rv1, rv2)** materiał zapasowy, **(czerwona strzałka)** okładzina wewnętrzna mostka międzykomórkowego, **(czarna strzałka)** okładzina zewnętrzna mostka międzykomórkowego; TEM. skala = 0,33µm



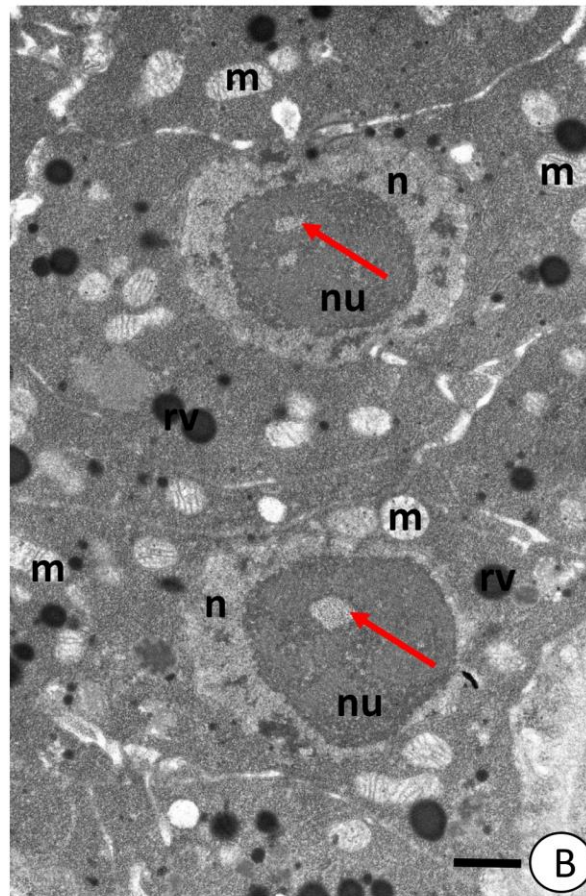
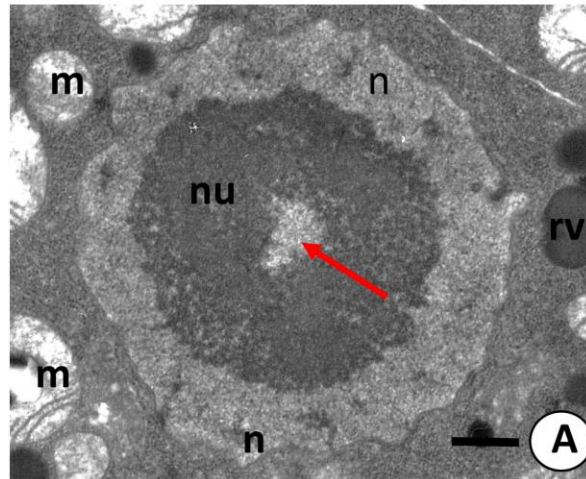
Fot. 26. Fragment jajnika *H. exemplaris*, komórki witelarium na etapie środkowej witelogenezy;

A. Na zdjęciu widoczne (**o**) oocyt, (**t**) trofocyt, (**j**) jelito środkowe, (**czerwona strzałka**) ściana jajnika, (**n**) jądro komórkowe, (**nu**) jąderko, (**m**) mitochondrium, niebieska strzałka – materiał zapasowy, strzałka zielona – pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie; TEM.
skala = 0,95μm



Fot. 27. Fragmenty komórek zespołu komórek płciowych (trofocyty i oocyt);

- A.** fragment oocytu; na zdjęciu widoczne (**n**) jądro oocytu, (**nu**) jąderko, (**czerwona strzałka**) wakuola jąderkowa, (**m**) mitochondria, (**rv**) żółtko; TEM; skala = 0,41 μm
- B.** fragment trofocytów; na zdjęciu widoczne (**n**) jądro oocytu, (**nu**) jąderko, (**czerwona strzałka**) wakuola jąderkowa, (**m**) mitochondria, (**rv**) materiał zapasowy; TEM; skala = 0,83 μm

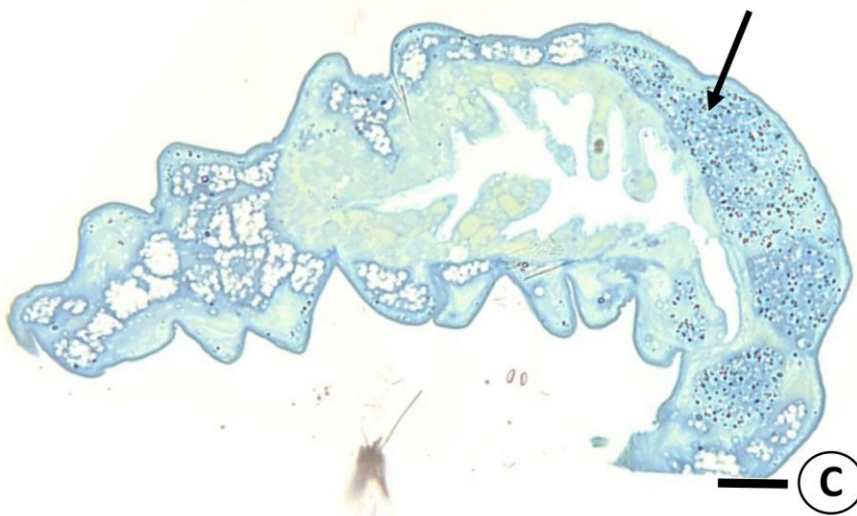
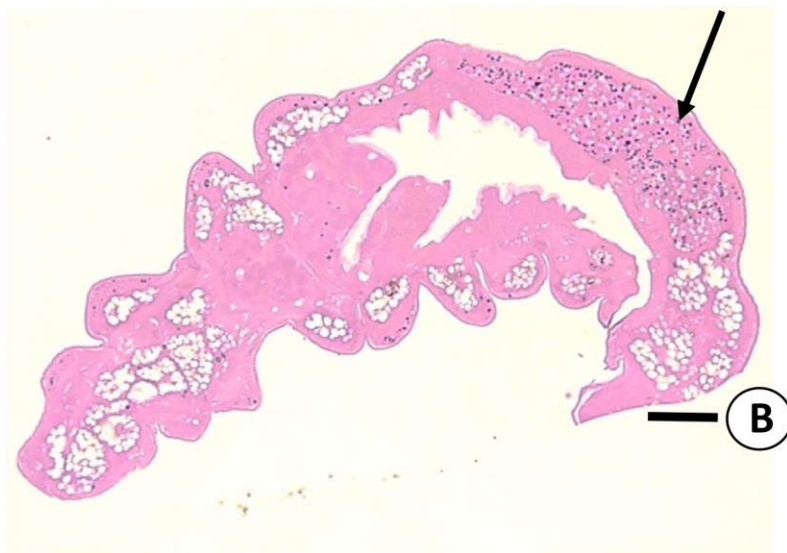
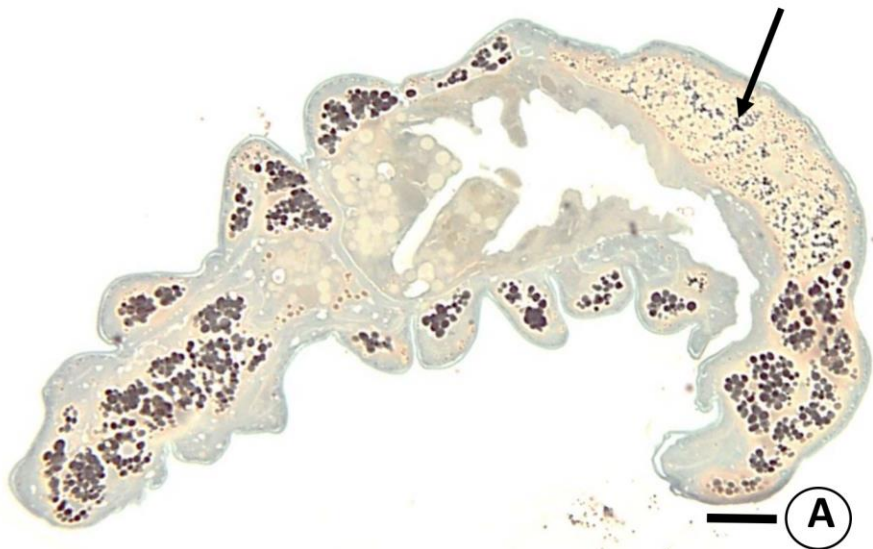


Fot. 28. Przekroje poprzeczne przez całe osobniki *H. exemplaris* na etapie środkowej witelogenezy, barwienia histochemiczne;

A. Detekcja lipidów: (**czarna strzałka**) lipidy na terenie komórek jajnika; Sudan Czarny B, mikroskop świetlny; skala = 3,7μm

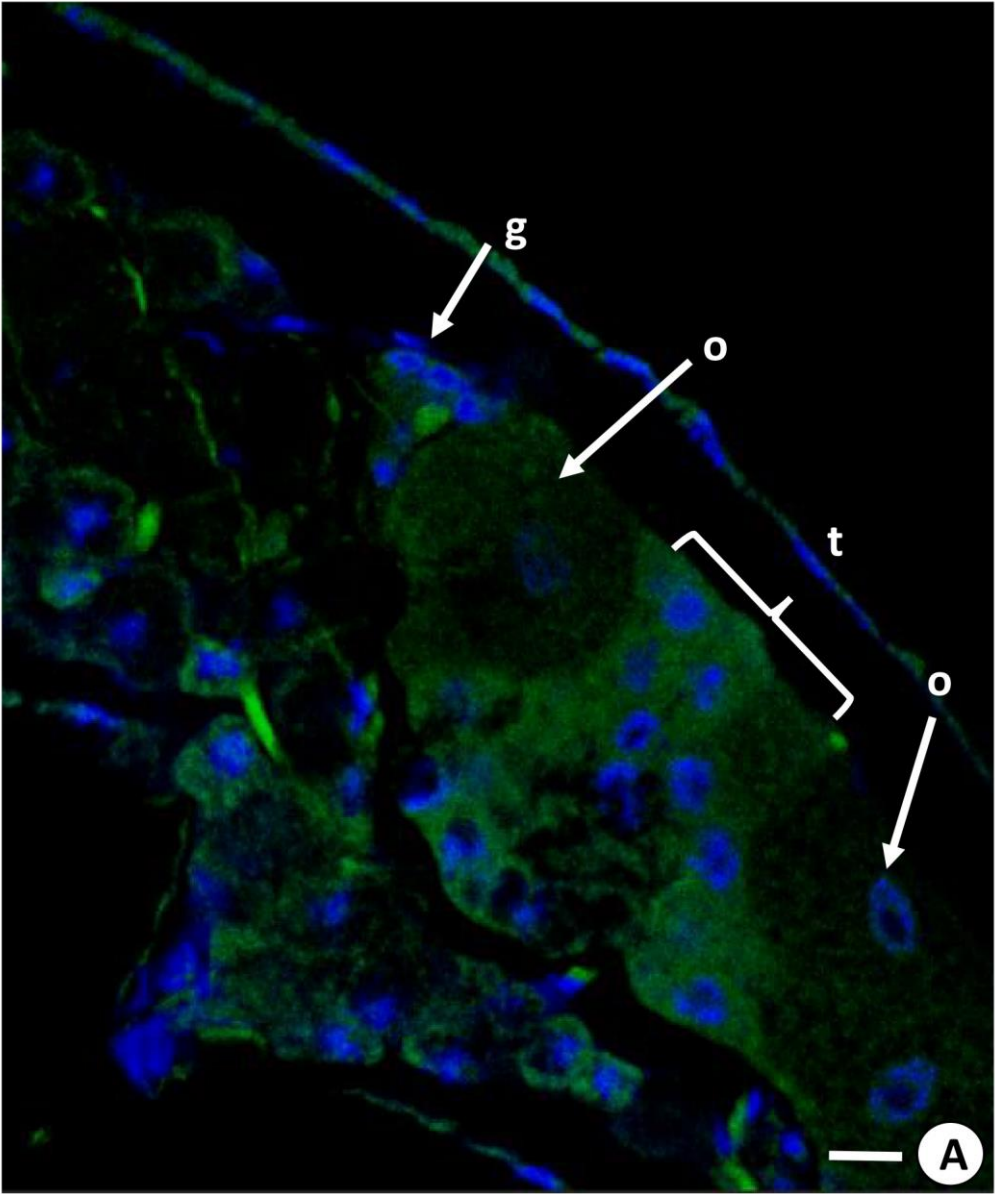
B. Detekcja polisacharydów: (**czarna strzałka**) polisacharydy na terenie komórek jajnika; Metoda PAS, mikroskop świetlny; skala = 3,8μm

C. Detekcja ciał białkowych: (**czarna strzałka**) ciała białkowe na terenie komórek jajnika; Metoda Bonhag'a, mikroskop świetlny; skala = 3,75μm



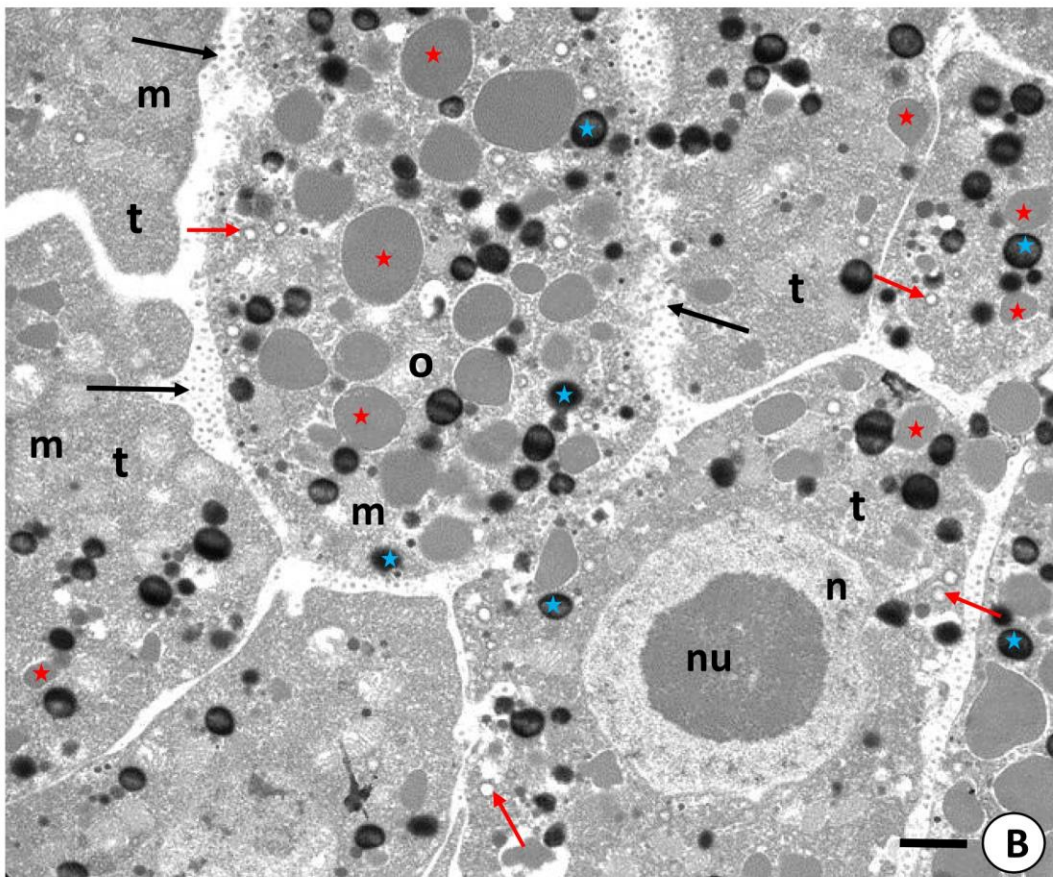
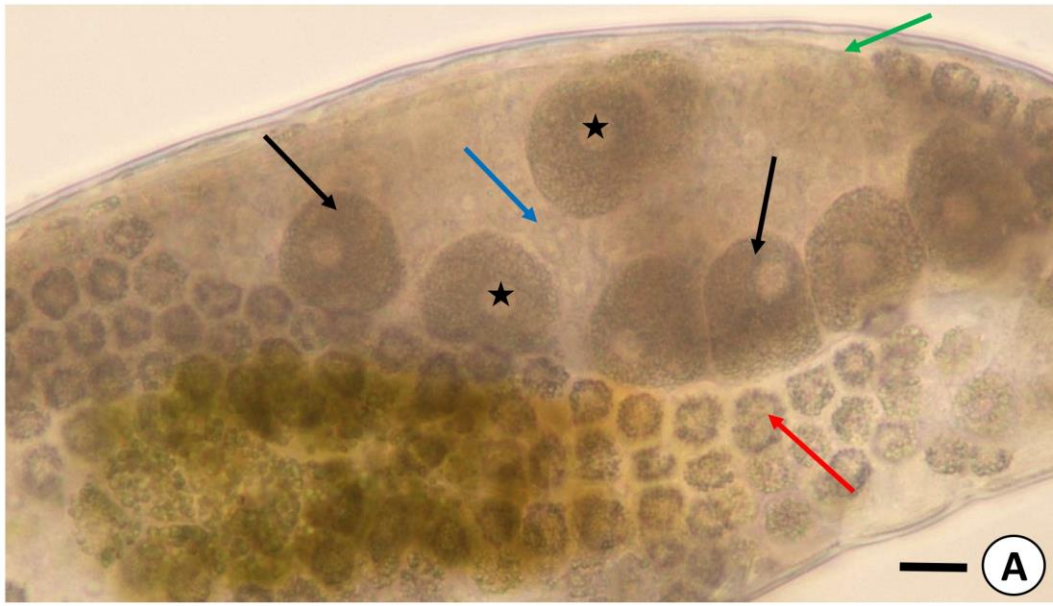
Fot. 29. Fragment jajnika *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy;

A. Falloidyna Oregon Green (lokalizacja F-aktyny), DAPI (znakowanie DNA). Na zdjęciu widoczne (g) germarium, (o) oocyt, (t) trofocyty; mikroskop konfokalny. skala = 14,4µm



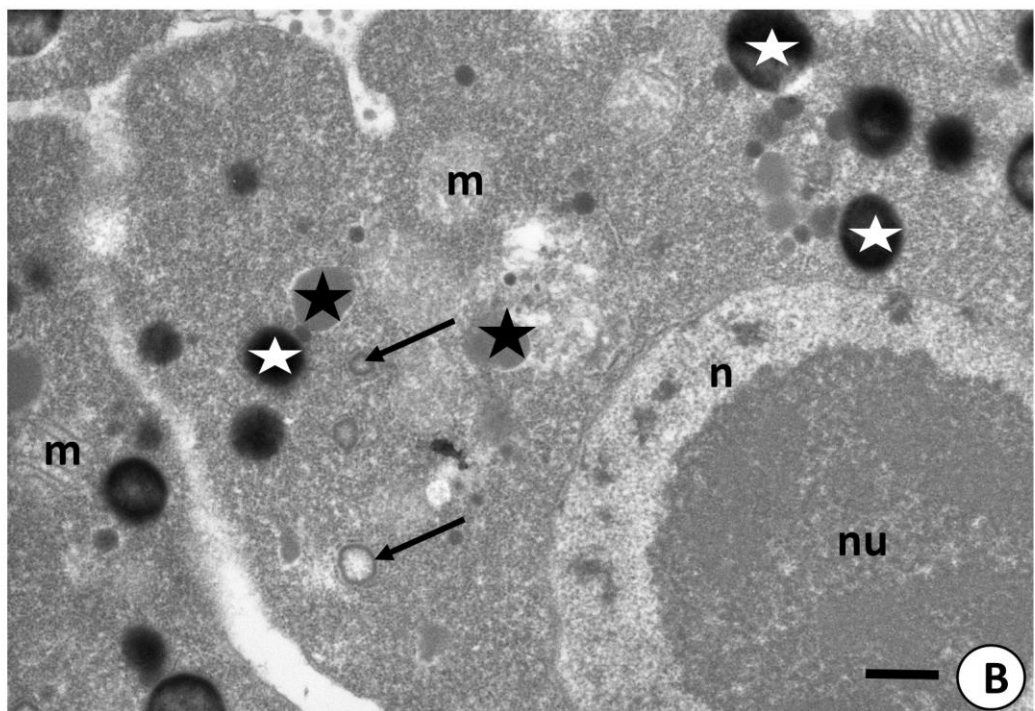
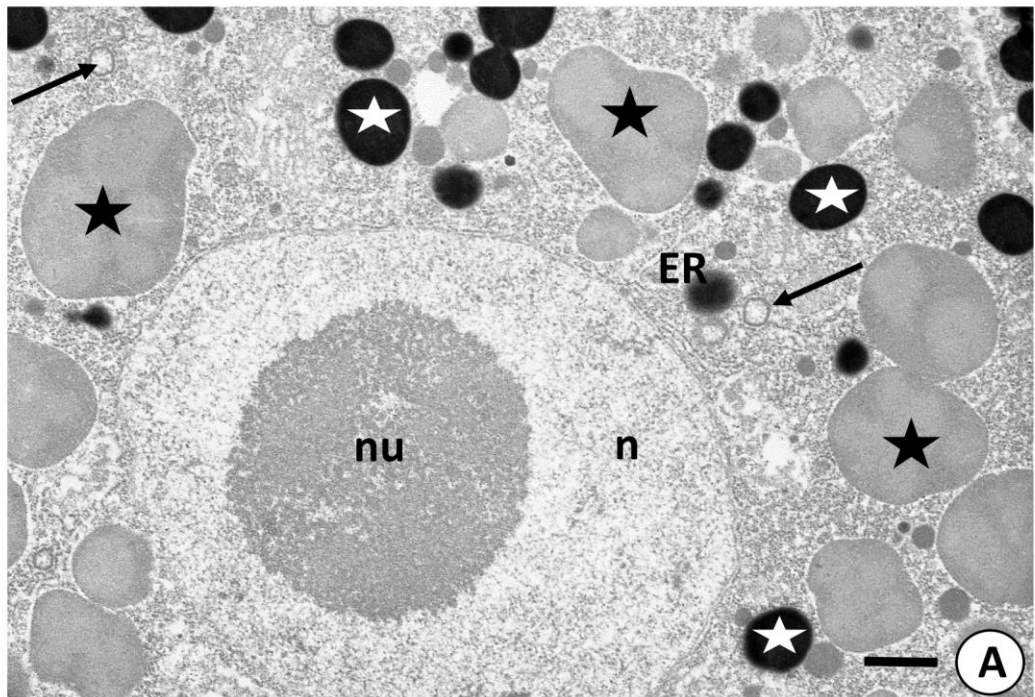
Fot. 30. Fragment jajnika *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy;

- A.** Fragment niesporczaka z jajnikiem wypełnionym oocytami, na zdjęciu widoczne (**czarna strzałka**) oocyt, (**niebieska strzałka**) trofocyt, (**gwiazdka**) jądro komórkowe oocyty, (**zielona strzałka**) ściana jajnika, (**czerwona strzałka**) ciało spichrzowe; mikroskopia świetlna. skala = 8,1 μm
- B.** Fragment zespołu komórek płciowych (**o**) – oocyt, (**t**) – trofocyt, (**n**) –jądro komórkowe, (**nu**)- jąderko, (**czarna strzałka**) – materiał na chorion, (**czerwona strzałka**) – pęcherzyk o elektronowo gęstej błonie komórkowej, (**niebieska gwiazda**) – materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, (**czerwona gwiazda**) - materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, (**m**) – mitochondrium, TEM. skala = 1,46 μm



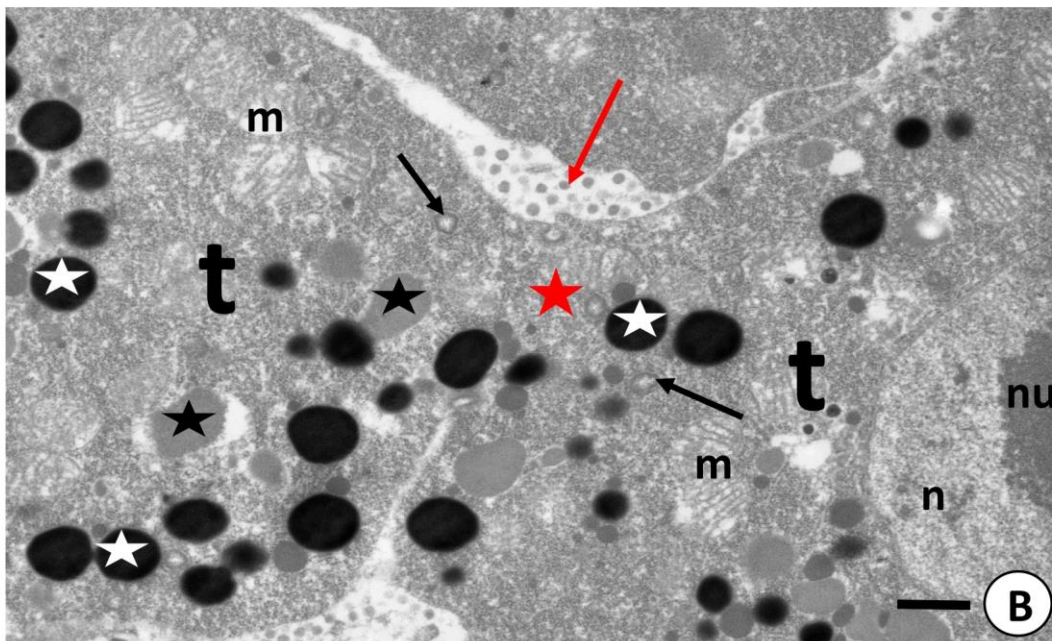
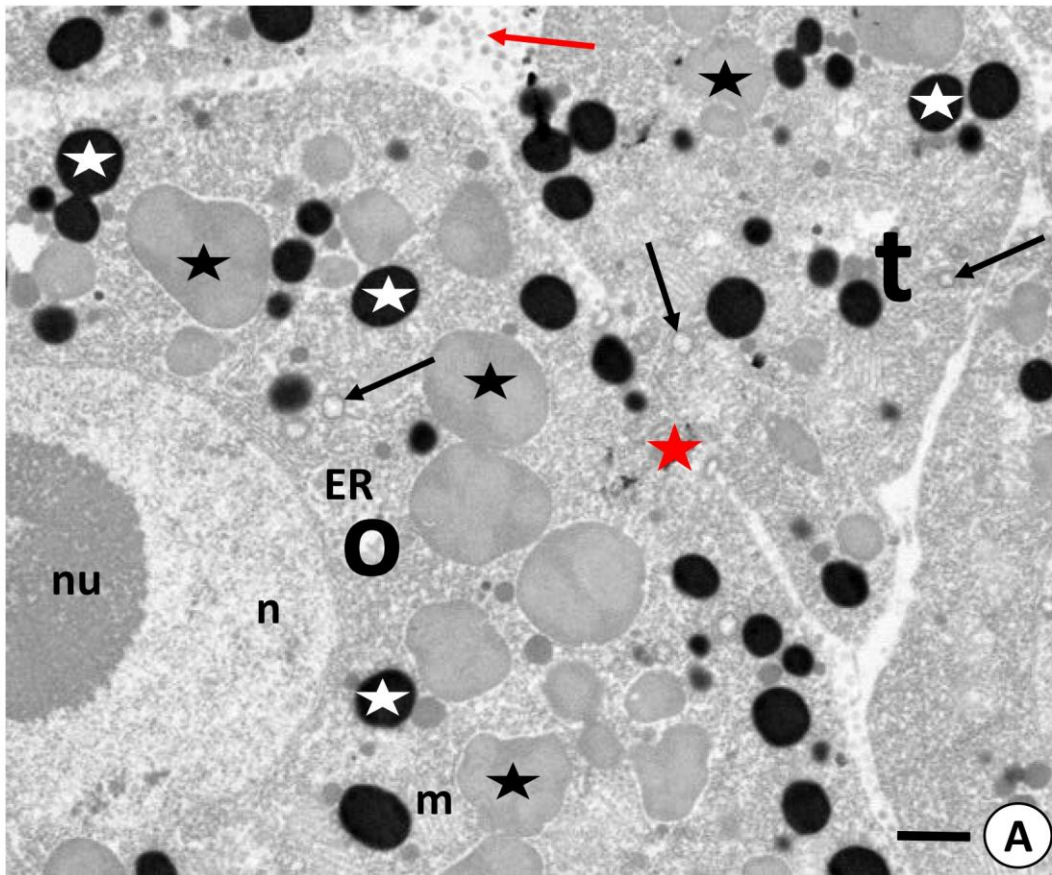
Fot. 31. Fragmenty komórek zespołu komórek płciowych *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy;

- A.** Fragment oocyty, na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(m)** mitochondrium, **(ER)** siateczka śródplamacyjna, **(biała gwiazda)** materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, **(czarna gwiazda)** materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, **(strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie komórkowej; TEM; skala = 0,83 μ m
- B.** Fragment trofocytu, na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(m)** mitochondrium, **(biała gwiazda)** materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, **(czarna gwiazda)** materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, **(strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie komórkowej; TEM; skala = 0,67 μ m



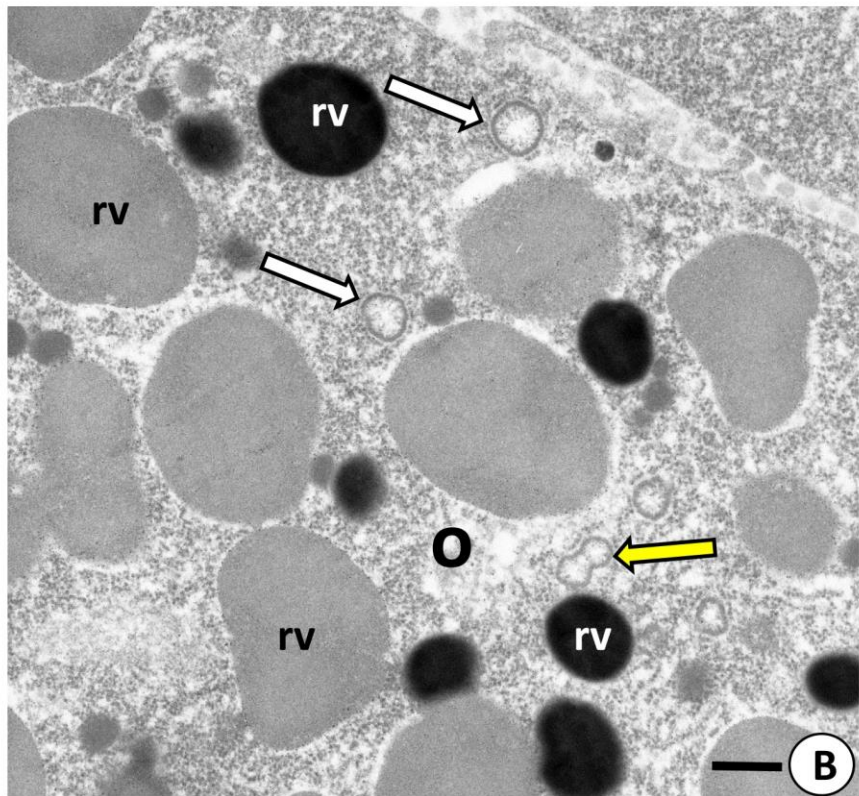
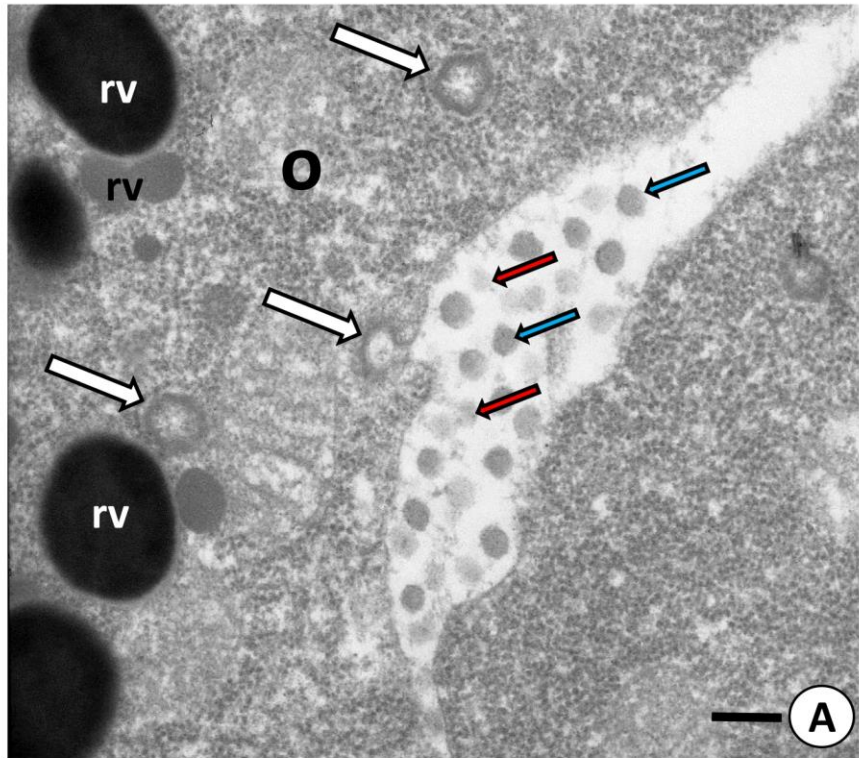
Fot. 32. Stabilne mostki międzykomórkowe łączące komórki w zespole komórek płciowych *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy (początek choriogenezy);

- A.** Mostek międzykomórkowy łączący oocyt z trofocytem; na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(o)** oocyt, **(t)** trofocyt, **(czerwona gwiazda)** mostek międzykomórkowy, **(czarna gwiazda)** materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, **(biała gwiazda)** materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, **(czarna strzałka)** pęcherzyk o elektronowo gęstej błonie komórkowej, **(czerwona strzałka)** materiał na chorion; TEM. skala = 0,86μm
- B.** Mostek międzykomórkowy łączący trofocyt z trofocytem; na zdjęciu widoczne **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(m)** mitochondrium, **(t)** trofocyt, **(czerwona gwiazda)** mostek międzykomórkowy, **(czarna gwiazda)** materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, **(biała gwiazda)** materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, **(czarna strzałka)** pęcherzyk o elektronowo gęstej błonie komórkowej, **(czerwona strzałka)** materiał na chorion; TEM. skala = 0,7μm



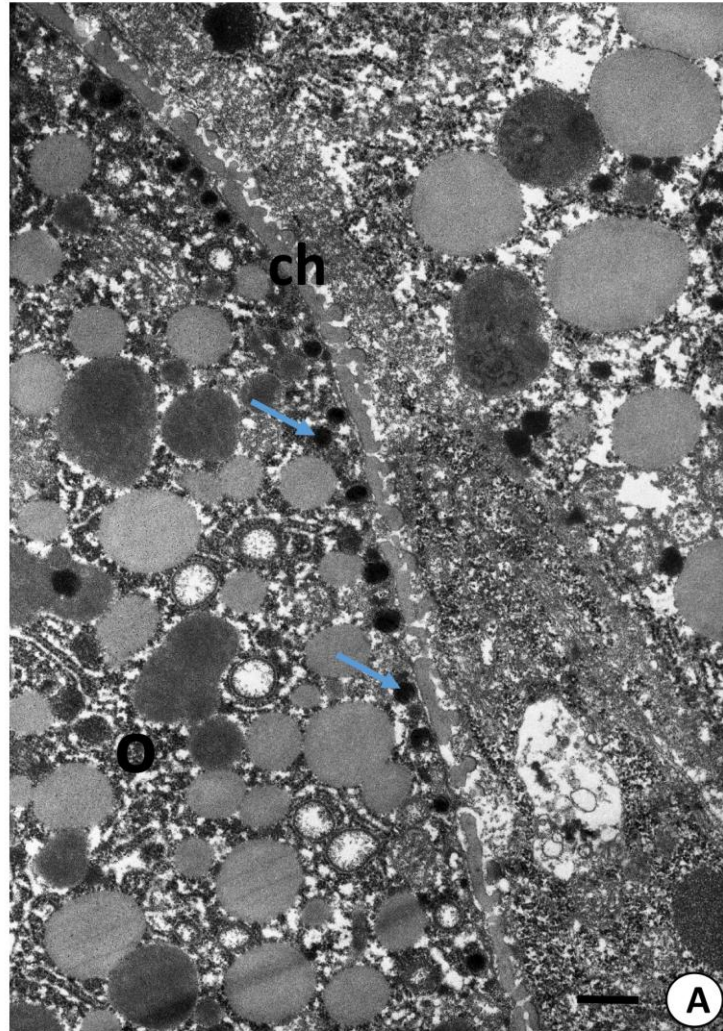
Fot. 33. Endocytoza prekursorów żółtka przez oocyt;

- A.** na zdjęciu widoczny (**o**) fragment oocyty, (**rv**) kule żółtka, (**biała strzałka**) pęcherzyki endocytarne z właczkowatym materiałem o elektronowo gęstej błonie, (**niebieska strzałka**) materiał na chorion, (**czerwona strzałka**) właczkowaty materiał o średniej gęstości elektronowej; TEM; skala = 0,33μm
- B.** na zdjęciu widoczny (**o**) fragment oocyty, (**rv**) kule żółtka, (**biała strzałka**) pęcherzyki endocytarne z właczkowatym materiałem o elektronowo gęstej błonie, (**żółta strzałka**) pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie ulegające fuzji; TEM; skala = 0,38μm



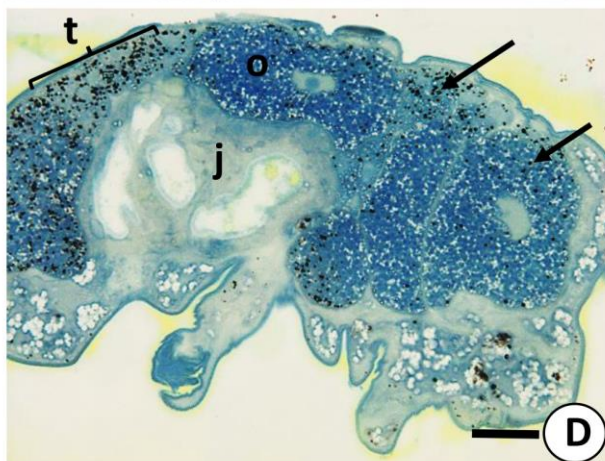
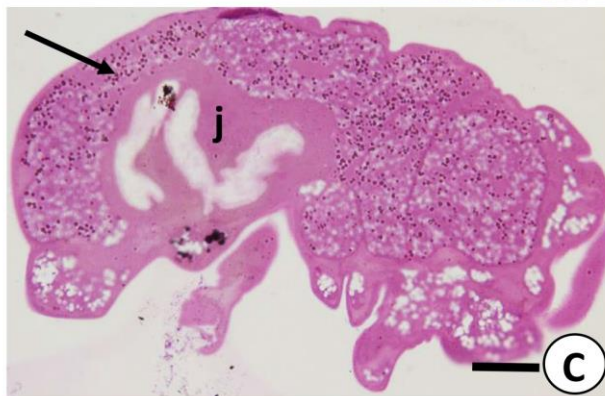
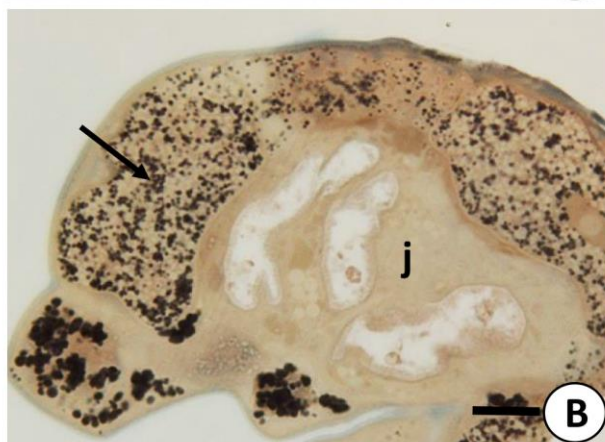
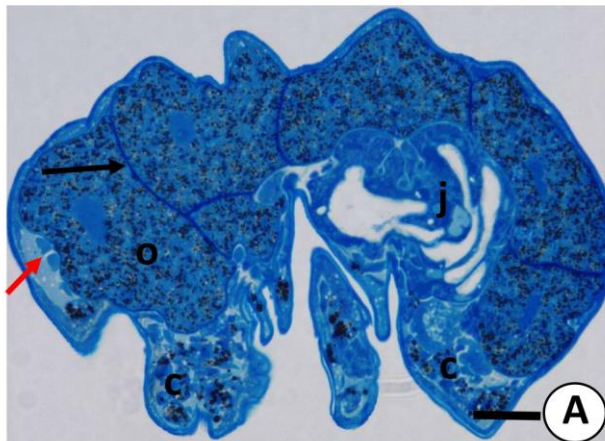
Fot. 34. Fragment oocyty *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy (choriogeneza); lokalizacja polisacharydów i mukopolisacharydów w cytoplazmie oocyty;

A. na zdjęciu widoczny (**o**) oocyt, (**ch**) tworzący się chorion, (**niebieska strzałka**) materiał o dużej gęstości elektronowej zawierający polisacharydy i mukopolisacharydy; barwienie czerwienią rutenu, TEM; skala = 0,6µm



Fot. 35. Przekroje poprzeczne przez *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy; detekcja materiałów zapasowych;

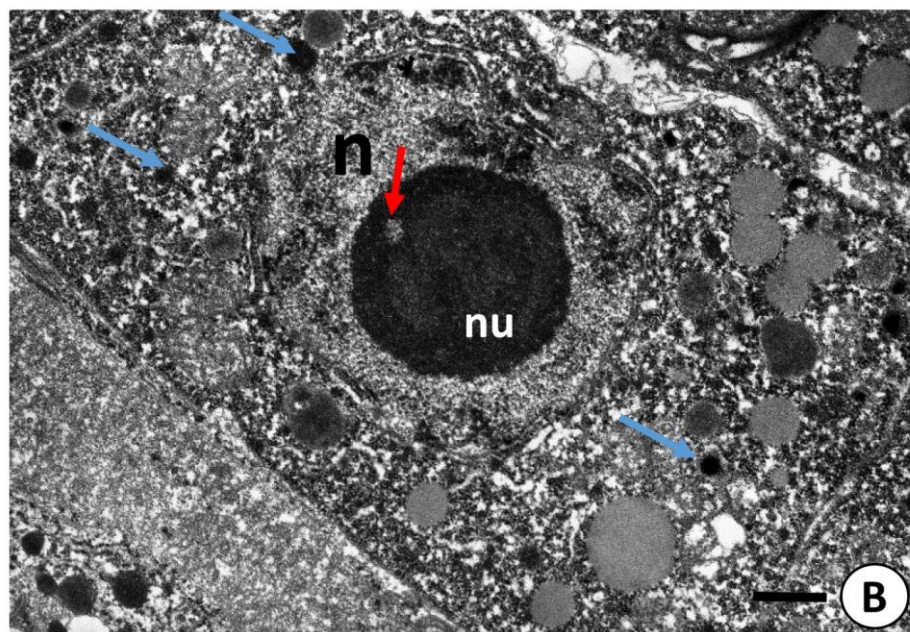
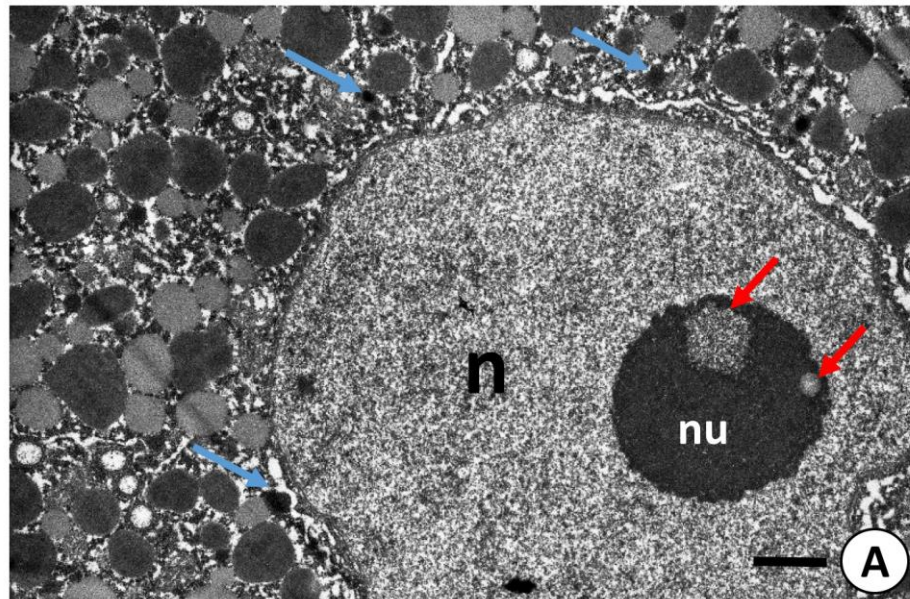
- A.** na zdjęciu widoczny **(o)** oocyt, **(j)** jelito środkowe, **(c)** ciała spichrzowe, **(czerwona strzałka)** germarium, **(czarna strzałka)** chorion; błękit metylenowym, mikroskop świetlny; skala = 9µm
- B.** Detekcja lipidów, na zdjęciu widoczne: **(j)** jelito środkowe, **(strzałka)** lipidy w komórkach jajnika; Sudan Czarny B, mikroskop świetlny; skala = 14,4µm
- C.** Detekcja polisacharydów, na zdjęciu widoczne: **(j)** jelito środkowe, **(strzałka)** polisacharydy w komórkach jajnika; metoda PAS, mikroskop świetlny; skala = 10,8µm
- D.** Detekcja ciał białkowych, na zdjęciu widoczny: **(o)** oocyt, **(t)** trofocyt, **(strzałka)** ciała białkowe w komórkach jajnika; metoda Bonhag'a, mikroskop świetlny; skala = 12,6µm



Fot. 36. Fragment komórek jajnika na etapie późnej witelogenezy; lokalizacja polisacharydów i mukopolisacharydów w cytoplazmie oocyty;

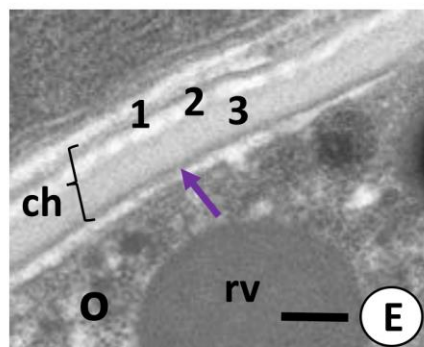
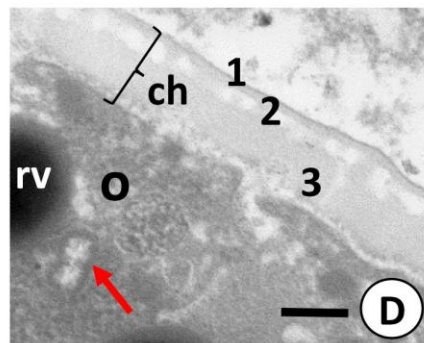
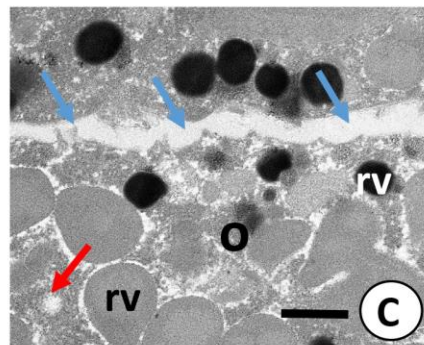
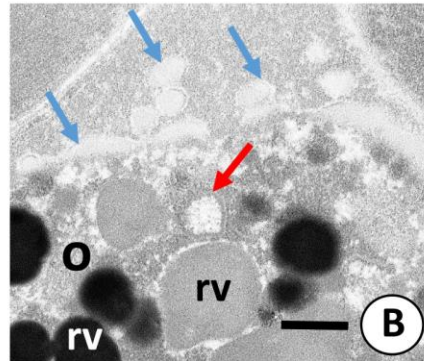
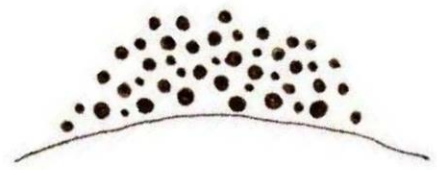
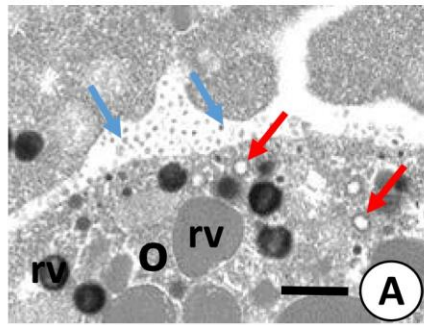
A. Oocyt, na zdjęciu widoczne: **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko, **(czerwona strzałka)** wakuola jąderkowa, **(niebieska strzałka)** materiał o dużej gęstości elektronowej zawierający polisacharydy i mukopolisacharydy, barwienie czerwienią rutenu, TEM; skala = 0,83µm

B. Trofocyt, na zdjęciu widoczne: **(n)** jądro komórkowe, **(nu)** jąderko komórkowe, **(czerwona strzałka)** wakuola jąderkowa, **(niebieska strzałka)** materiał o dużej gęstości elektronowej zawierający polisacharydy i mukopolisacharydy, barwienie czerwienią rutenu, TEM; skala = 0,79µm



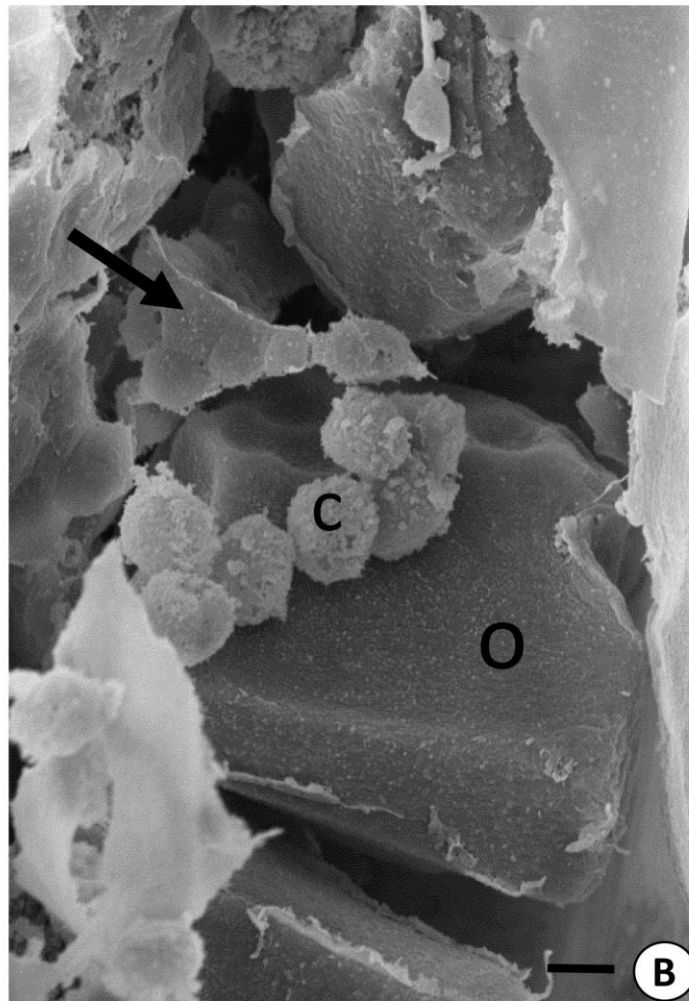
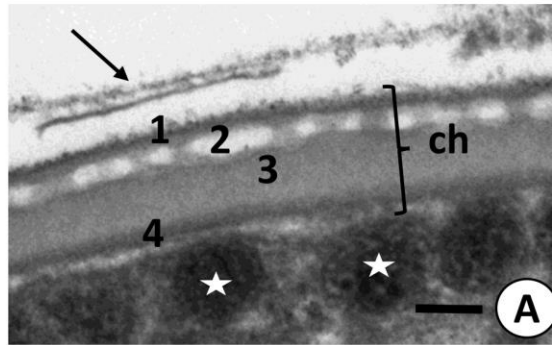
Fot. 37. Proces choriogenezy *H. exemplaris*;

- A.** Gromadzący się wokół oolemmy materiał na chorion w postaci kuleczek o średniej gęstości elektronowej; na zdjęciu widoczne: **(o)** fragment oocytu, **(rv)** kule żółtka, **(czerwona strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie, **(niebieska strzałka)** materiał na chorion; TEM. skala = 1,67 μ m
- B.** Materiał na chorion tworzący większe skupiska, deponowany na powierzchni oolemmy w postaci nieciągłej warstwy; na zdjęciu widoczne: **(o)** fragment oocytu, **(rv)** kule żółtka, **(czerwona strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie, **(niebieska strzałka)** materiał na chorion; TEM. skala = 0,44 μ m
- C.** Materiał na chorion deponowany na powierzchni oolemmy tworzący jedną, ciągłą warstwę; na zdjęciu widoczne: **(o)** fragment oocytu, **(rv)** kule żółtka, **(czerwona strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie, **(niebieska strzałka)** materiał na chorion; TEM. skala = 0,89 μ m
- D.** Wykształcone trzy warstwy w obrębie chorionu i tworząca się osłona żółtkowa; na zdjęciu widoczne: **(o)** fragment oocytu, **(rv)** kule żółtka, **(czerwona strzałka)** pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie ulegające fuzji, **(ch)** chorion; **(1)** warstwa zewnętrzna chorionu, **(2)** warstwa labiryntowa chorionu, **(3)** warstwa wewnętrzna chorionu; TEM. skala = 0,2 μ m
- E.** W pełni wykształcona kapsuła jajowa *H. exemplaris* zbudowana z trójwarstwowego chorionu i osłony żółtkowej; na zdjęciu widoczny **(o)** fragment oocytu, **(rv)** kule żółtka, **(ch)** chorion; **(1)** warstwa zewnętrzna chorionu, **(2)** warstwa labiryntowa chorionu, **(3)** warstwa wewnętrzna chorionu, **(fioletowa strzałka)** osłona żółtkowa; TEM. skala = 0,25 μ m



Fot. 38. Kapsuła jajowa *H. exemplaris*;

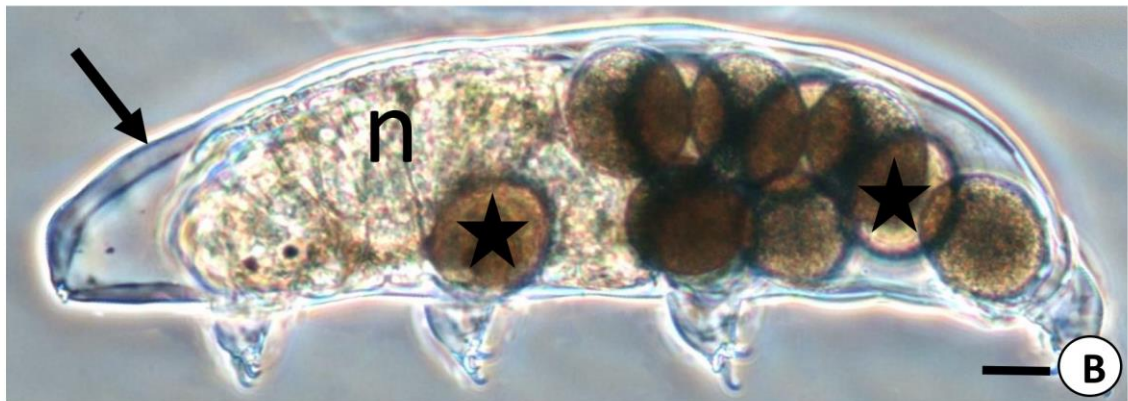
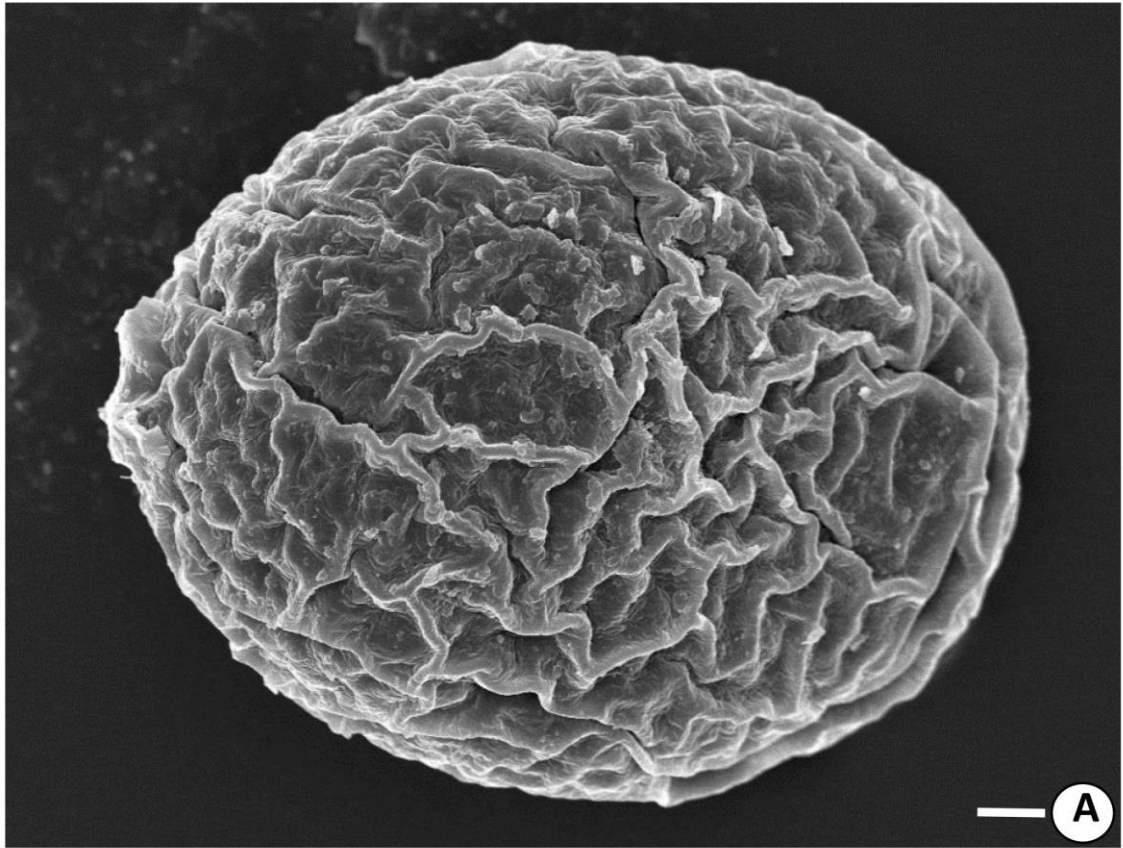
- A.** W pełni wykształcona kapsuła jajowa; na zdjęciu widoczna (**strzałka**) silnie rozciągnięta i spłaszczona ściana jajnika, (**ch**) trójwarstwowy chorion, (**1**) warstwa zewnętrzna chorionu, (**2**) warstwa labiryntowa chorionu, (**3**) warstwa wewnętrzna chorionu, (**4**) osłona żółtkowa, (**gwiazdka**) ziarna korowe; TEM. skala = 0,22µm
- B.** Wnętrze ciała niesporczaka od strony grzbietowej; na zdjęciu widoczny (**o**) oocyt, (**strzałka**) trofocyty, (**c**) ciała spichrzowe; SEM. skala = 2,42µm



Fot. 39. Jajo *H. exemplaris* oraz samica w trakcie owipozycji;

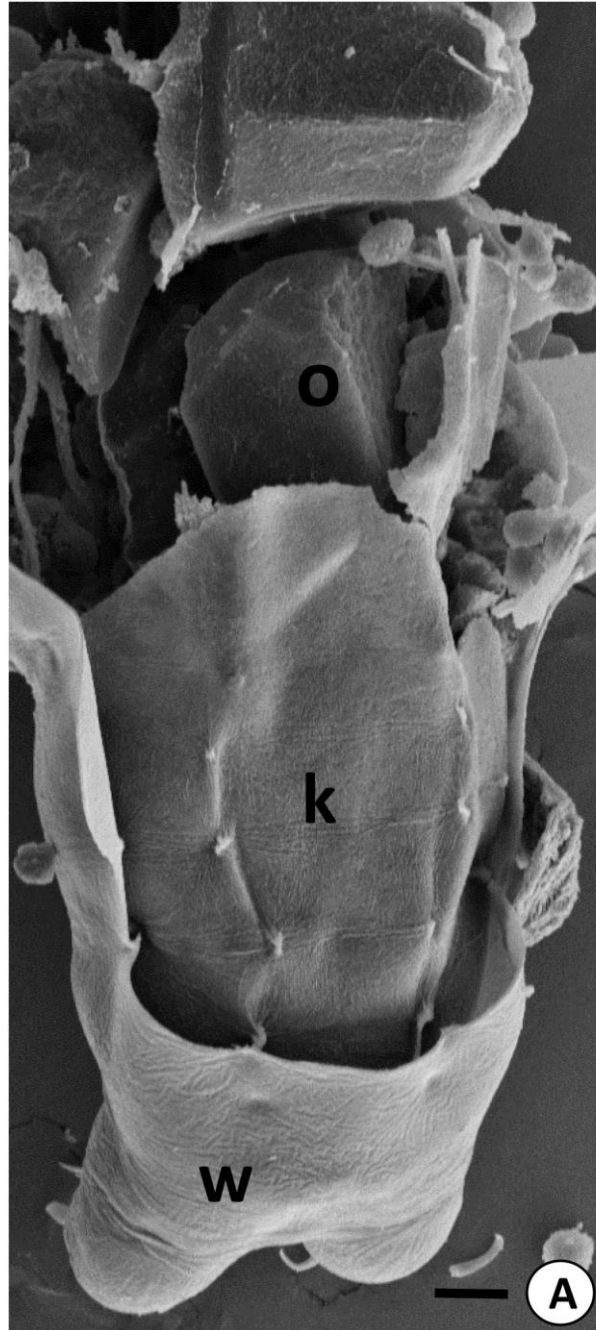
A. Powierzchnia kapsuły jajowej *H. exemplaris*; SEM; skala = 25,48µm

B. Samica wewnątrz wylinki w trakcie owipozycji; na zdjęciu widoczny (**n**) niesporczak, (**strzałka**) wylinka, (**gwiazda**) złożone jaja; kontrast nomarskiego, mikroskopia świetlna, skala = 3,84µm



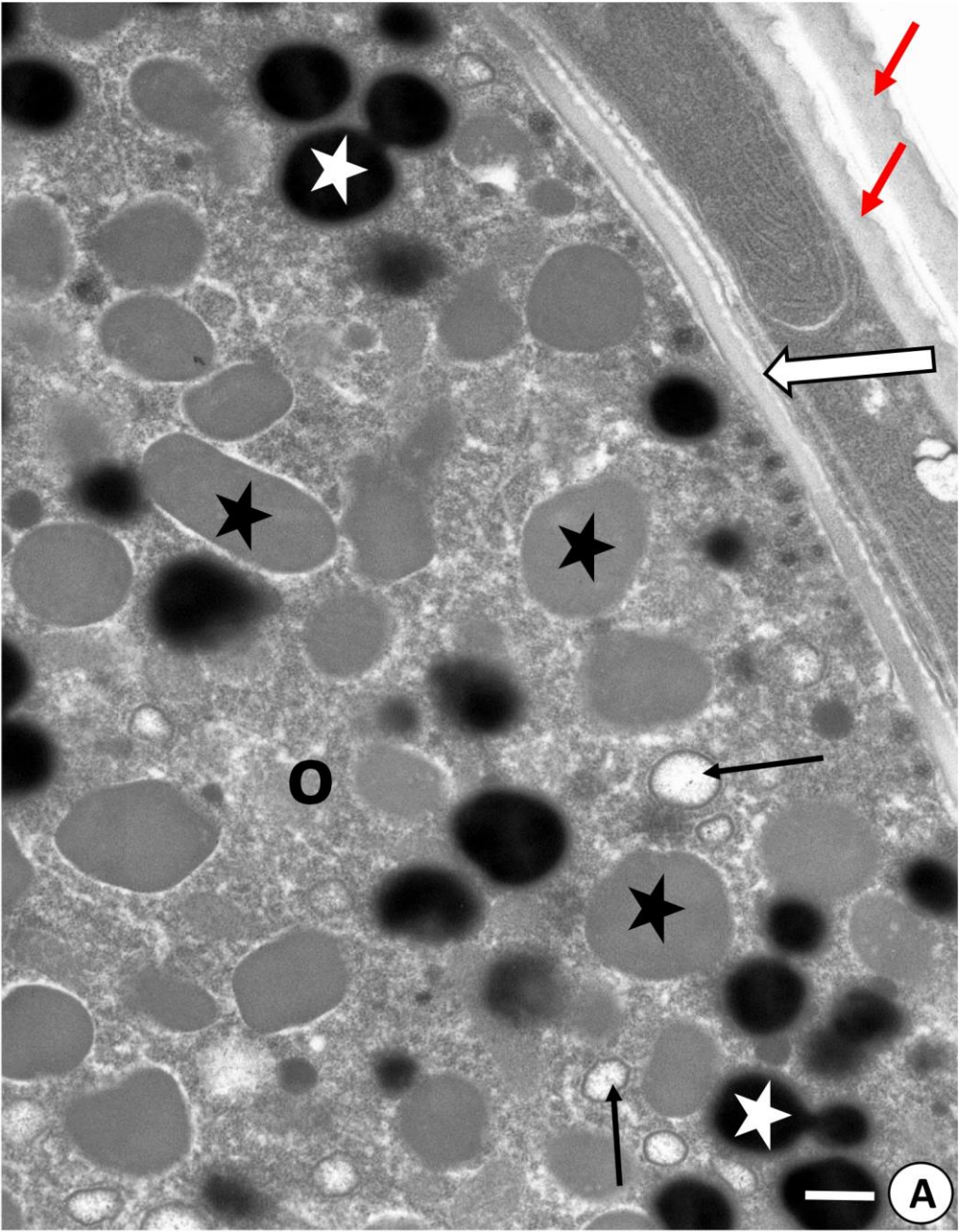
Fot. 40. Fragment części grzbietowej niesporczaka *H. exemplaris*;

A. na zdjęciu widoczny (**o**) oocyt, (**k**) nowa kutikula, (**w**) stara kutikula przygotowana do linienia; SEM, skala = 1,34µm



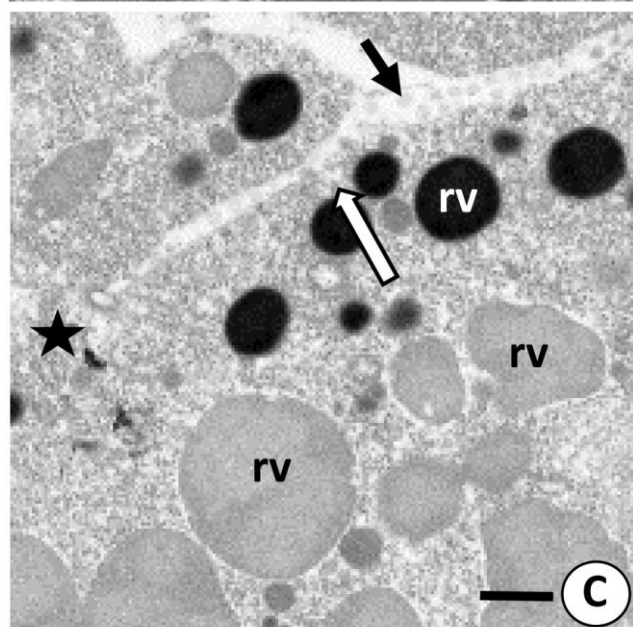
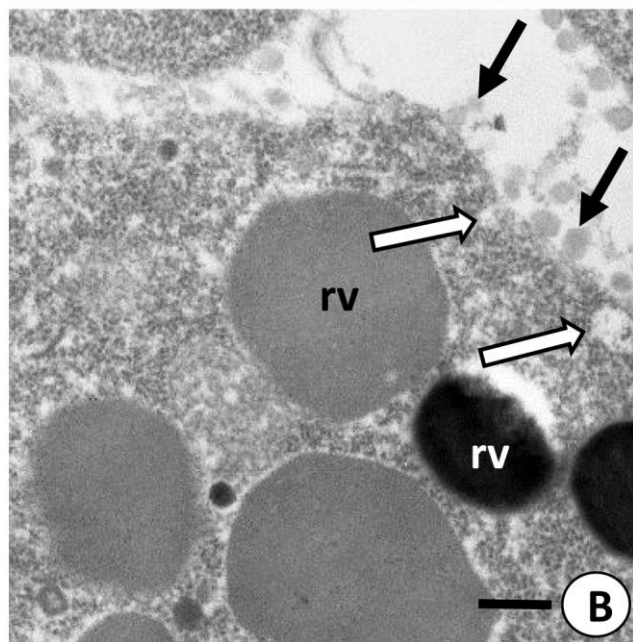
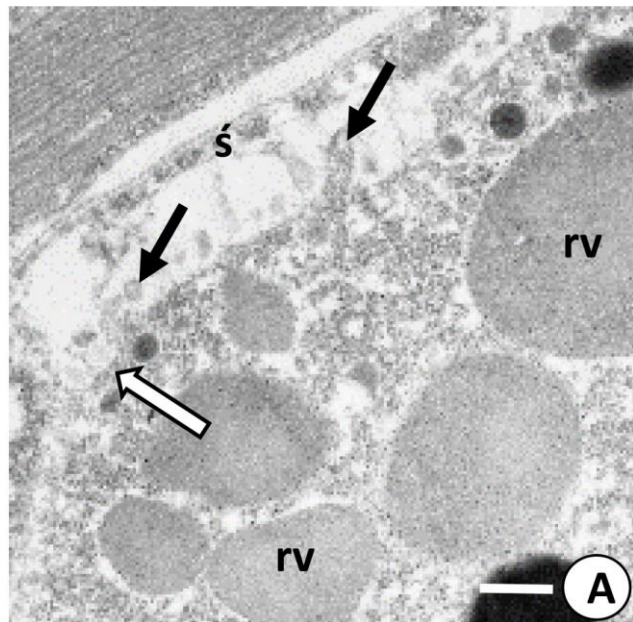
Fot. 41. Fragment oocyty z w pełni wykształconą kapsułą jajową i dwiema warstwami kutikuli;

A. na zdjęciu widoczny (**o**) oocyt, (**czarna strzałka**) pęcherzyki o elektronowo gęstej błonie, (**biała strzałka**) kapsuła jajowa; (**czerwona strzałka**) dwie warstwy kutikuli, (**biała gwiazda, czarna gwiazda**) kule żółtka o różnych gęstościach elektronowych; TEM, skala = 0,57 μ m



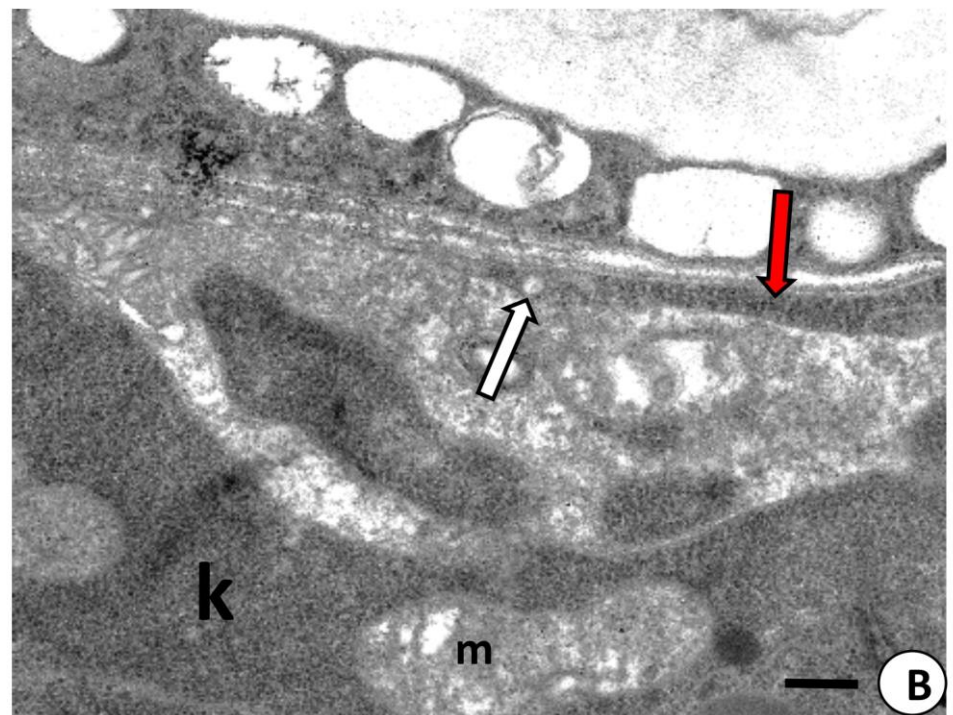
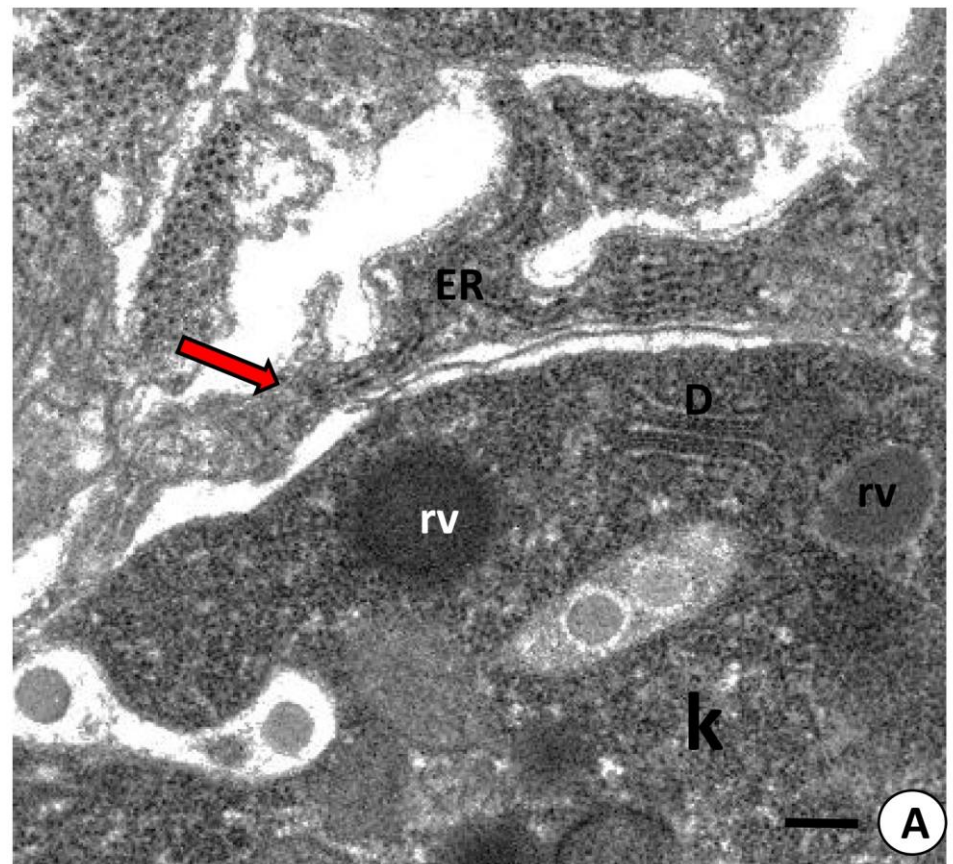
Fot. 42. Tworzenie kapsuły jajowej *H. exemplaris*;

- A.** Wydzielanie materiałów na chorion; na zdjęciu widoczna (**ś**) ściana jajnika, (**rv**) kule żółtka, (**biała strzałka**) pęcherzyk egzocytarny, (**czarna strzałka**) materiał na chorion; TEM; skala = 0,42μm
- B.** Wydzielanie materiałów na chorion; na zdjęciu widoczne (**rv**) kule żółtka, (**biała strzałka**) pęcherzyk egzocytarny, (**czarna strzałka**) materiał na chorion; TEM; skala = 0,37μm
- C.** Wydzielanie materiałów na chorion; na zdjęciu widoczne (**rv**) kule żółtka, (**biała strzałka**) pęcherzyk egzocytarny, (**czarna strzałka**) materiał na chorion, (**gwiazdka**) mostek międzykomórkowy; TEM; skala = 0,55μm



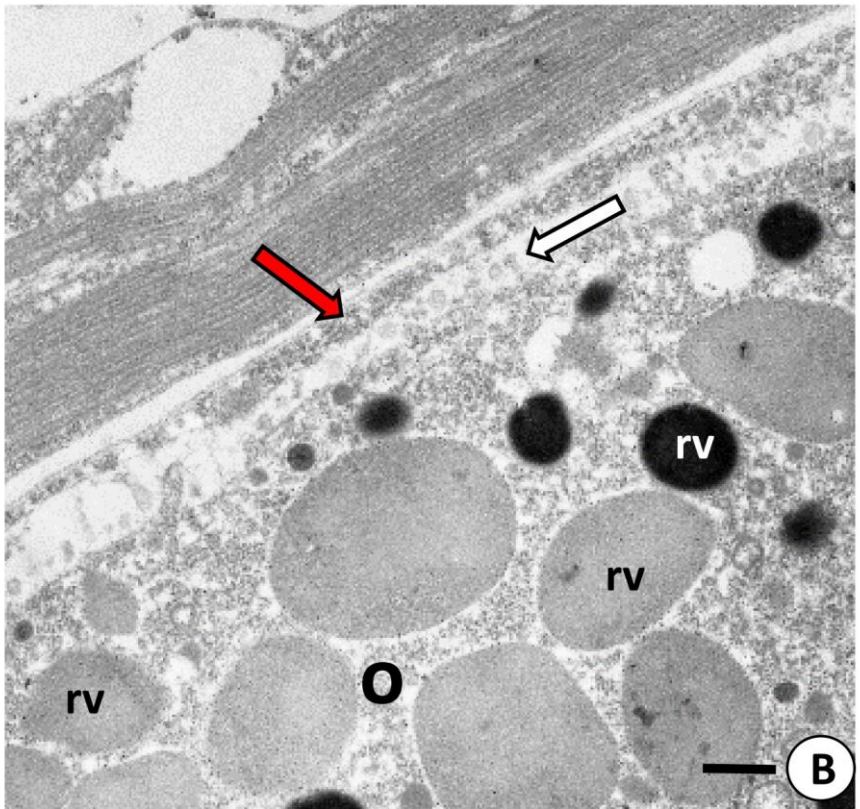
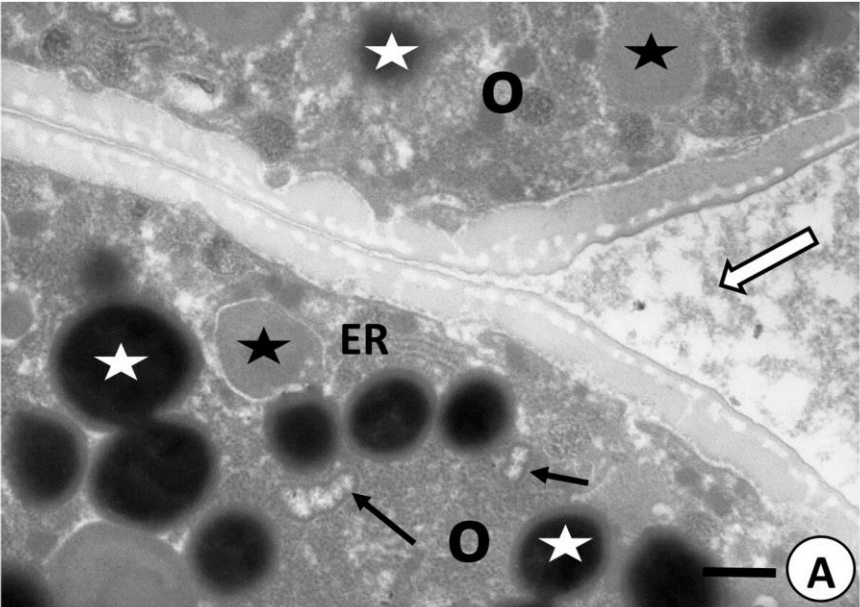
Fot. 43. Fragment ściany jajnika *H. exemplaris*;

- A.** fragment komórki płciowej i ściany jajnika; na zdjęciu widoczna (**ER**) siateczka śródplazmatyczna w (**czerwona strzałka**) ścianie jajnika, (**k**) komórka płciowa, (**D**) diktiosom, (**rv**) kule materiału zapasowego, TEM; skala = 0,36μm
- B.** fragment komórki płciowej i ściany jajnika; na zdjęciu widoczny (**biała strzałka**) pęcherzyk egzocytarny wewnątrz (**czerwona strzałka**) ściany jajnika, (**k**) komórka płciowa, (**m**) mitochondria; TEM; skala = 0,34μm

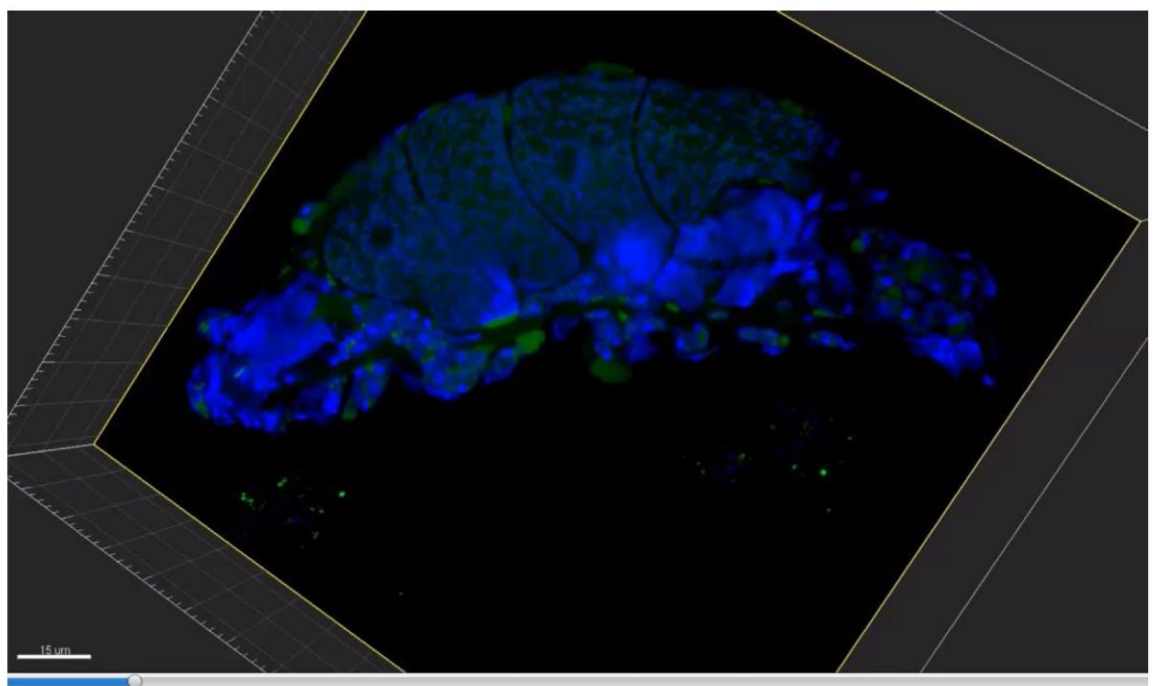


Fot. 44. Fragment oocyty z gromadzącym się kłaczkowatym materiałem na chorion w okolicy oolemy;

- A.** Oocyt z tworzącą się kapsułą jajową: na zdjęciu widoczny **(o)** fragment oocyty, **(biała gwiazda)** materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, **(czarna gwiazda)** materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, **(ER)** siateczka śródplazmatyczna, **(czarna strzałka)** pęcherzyk o elektronowo gęstej błonie komórkowej, **(biała strzałka)** kłaczkowaty materiał na budowę chorionu; TEM; skala = 0,37μm
- B.** na zdjęciu widoczny **(o)** fragment oocyty, **(czerwona strzałka)** ściana jajnika, **(biała strzałka)** kłaczkowaty materiał na budowę chorionu, **(rv)** kule żółtka, TEM; skala = 0,48μm

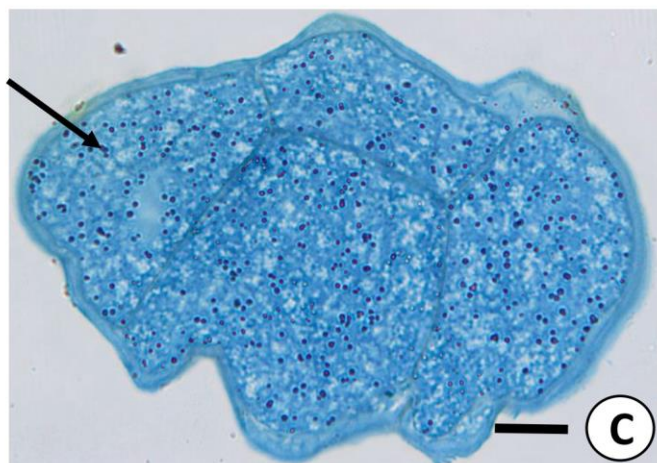
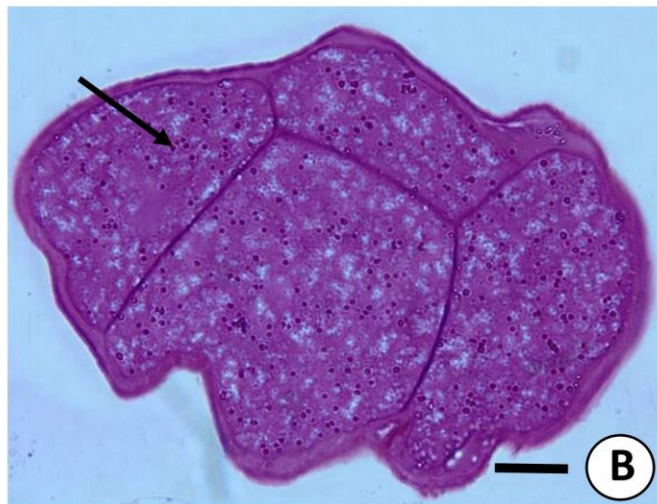
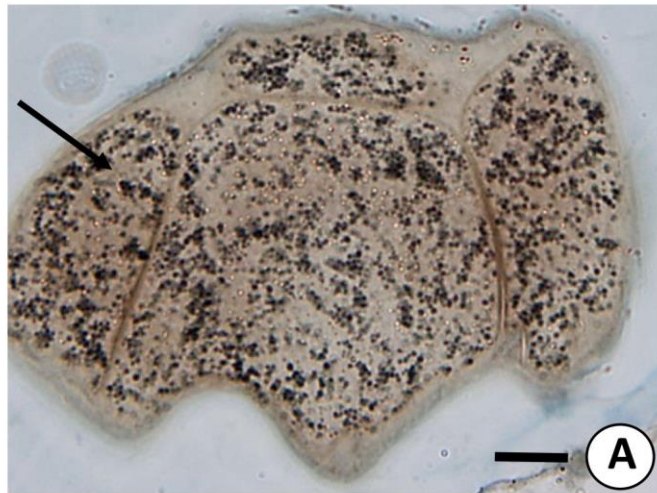


Film 4. Osobnik *H. exemplaris* na końcowym etapie oogenezy. Widoczne olbrzymie oocyty, trofocyty skupione między oocytami. Znakowanie kropli lipidowych w oocytach, trofocytach oraz ciałek spichrzowych odczynnikiem BODIPY 483/503 (zielone sygnały), jądra znakowane odczynnikiem DAPI (sygnał niebieski); mikroskop konfokalny.



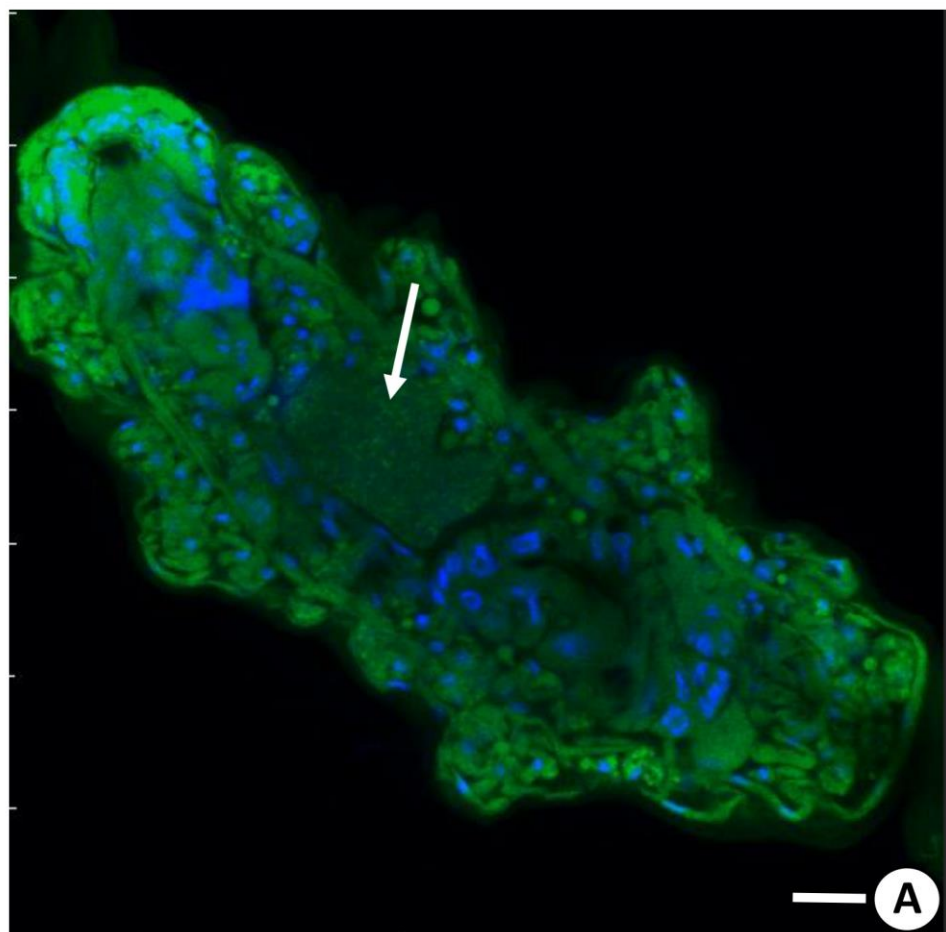
Fot. 45. Żółtko gromadzone w oocytach na zaawansowanym etapie oogenezy;

- A.** Detekcja lipidów, na zdjęciu widoczne (**czarna strzałka**) lipidy, Sudan Czarny B; mikroskop świetlny; skala = 19,8μm
- B.** Detekcja polisacharydów, na zdjęciu widoczne (czarna strzałka) polisacharydy, metoda PAS; mikroskop świetlny; skala = 20,4μm
- C.** Detekcja ciał białkowych, (**czarna strzałka**) ciała białkowe; metoda Bonhag'a, mikroskop świetlny; skala = 21,2μm



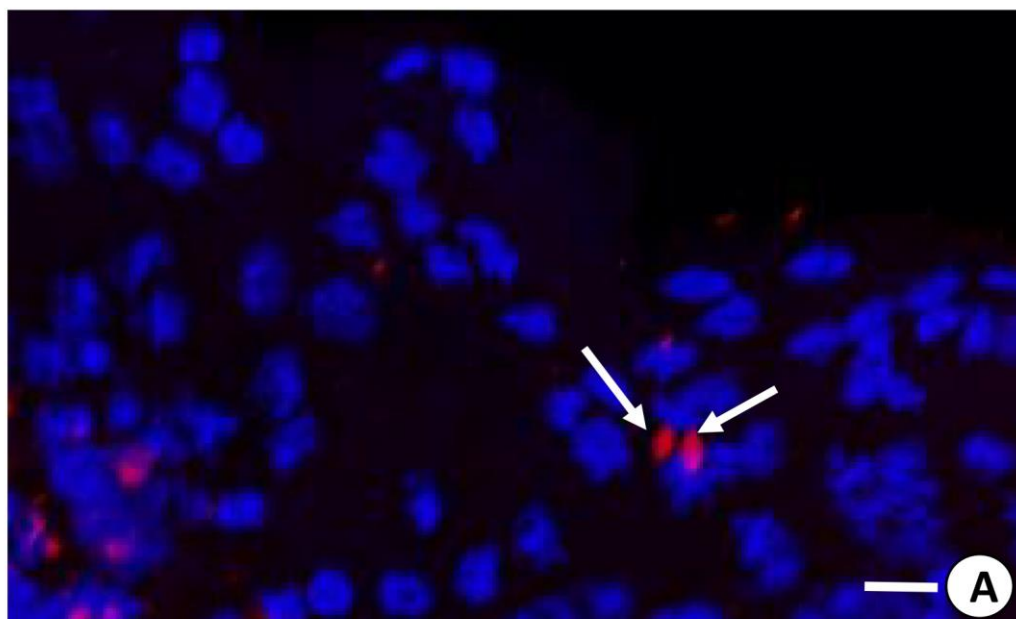
Fot. 46. Osobnik *H. exemplaris* na etapie zaawansowanej oogenezy; detekcja kropli lipidowych odczynnikiem BODIPY 483/503 oraz DNA odczynnikiem DAPI;

A. na zdjęciu widoczne (**strzałka**) krople lipidowe (zielony sygnał), jądra komórkowe (niebieski sygnał); mikroskop konfokalny; skala = 12,6µm



Fot. 47. Fragment jajnika *H. exemplaris* na zaawansowanym etapie oogenezy, tuż przed owipozycją;

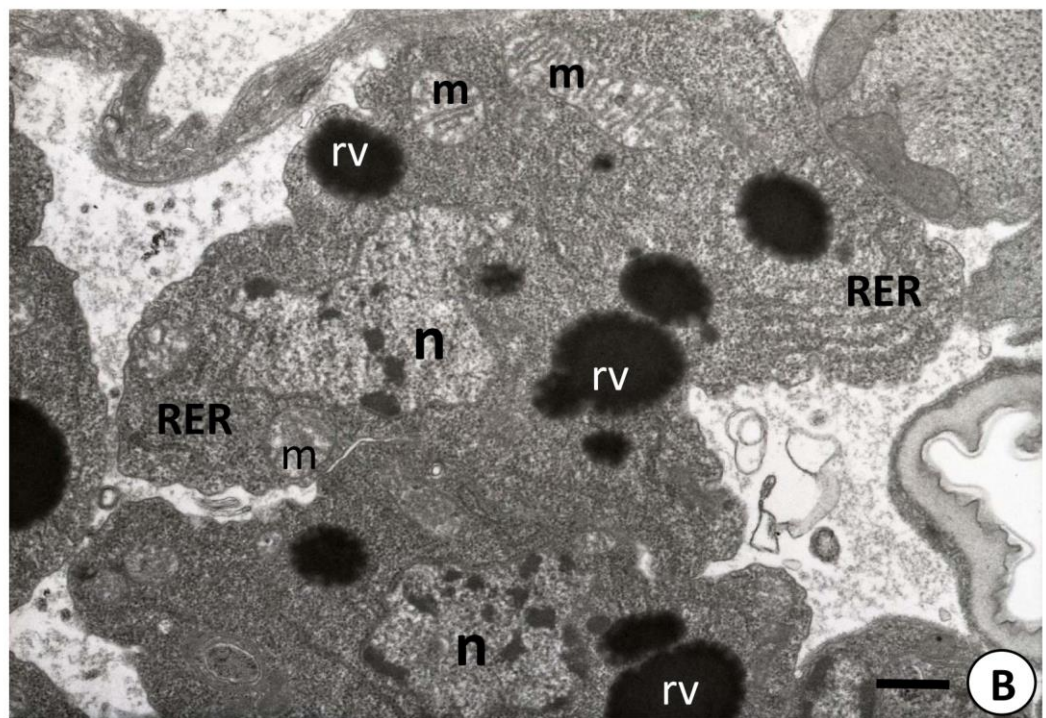
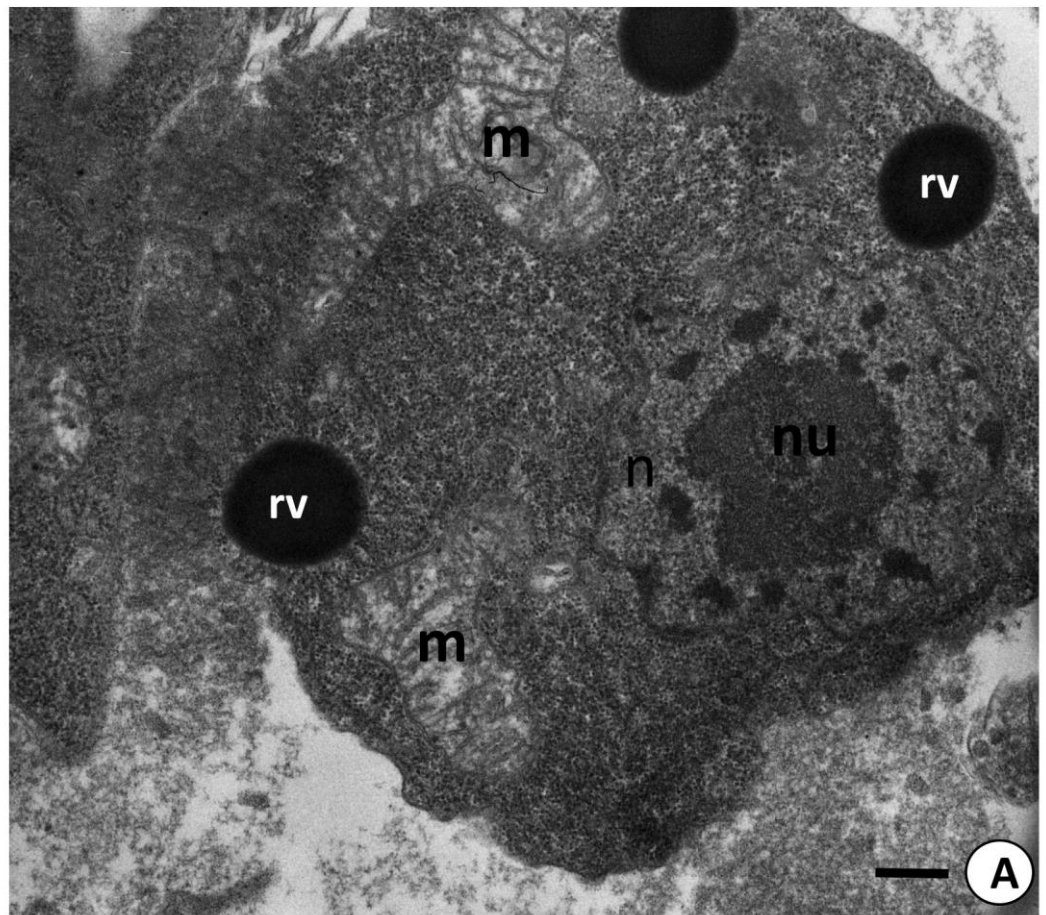
A. na zdjęciu widoczne czerwone sygnały z komórek podlegających apoptozie oraz niebieskie sygnały jąder komórkowych, TUNEL + DAPI, mikroskop konfokalny. skala = 7,2µm



Fot. 48. Ciałka spichrzowe *H. exemplaris* na początkowych etapach oogenezy;

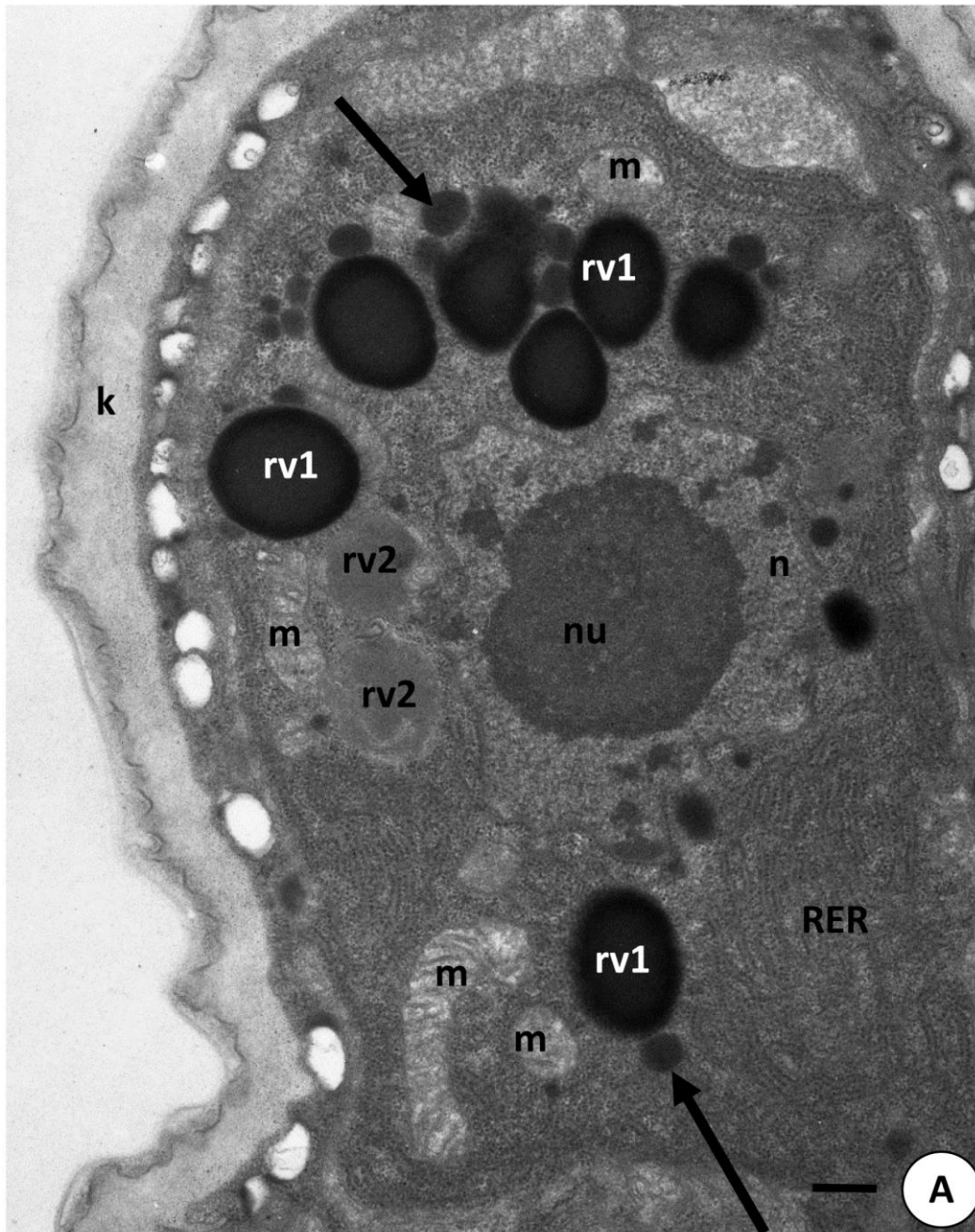
A. na zdjęciu widoczne (**nu**) jąderko, (**n**) jądro komórkowe, (**m**) mitochondrium, (**rv**) materiał zapasowy; TEM; skala = 0,53 μ m

B. na zdjęciu widoczne (**nu**) jąderko, (**n**) jądro komórkowe, (**m**) mitochondrium, (**rv**) materiał zapasowy, (**RER**) szorstka siateczka śródplazmatyczna; TEM; skala = 0,42 μ m



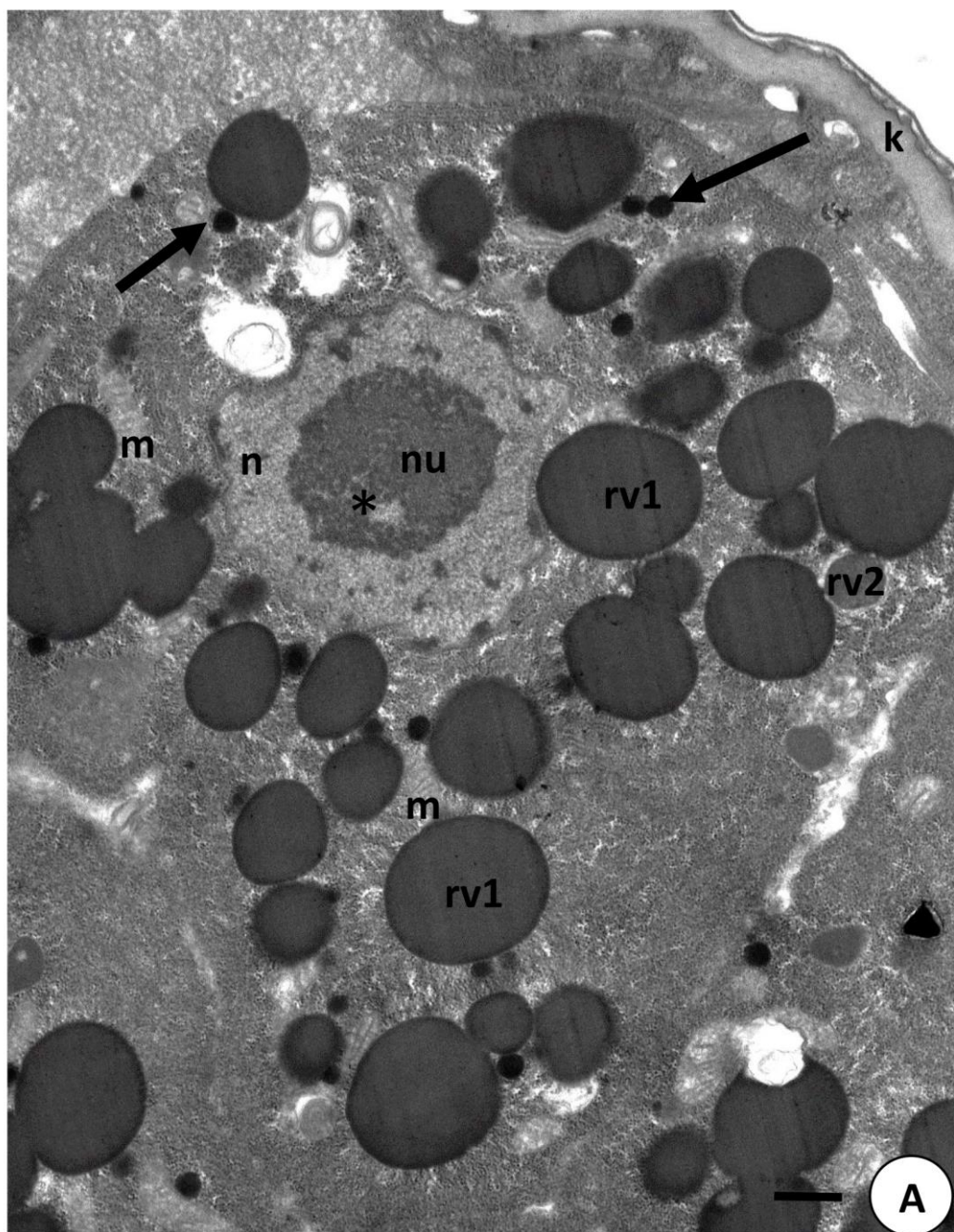
Fot. 49. Ciało spichrzowe *H. exemplaris* na etapie witelogenezy;

A. na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe, (**nu**) jąderko komórkowe, (**m**) mitochondrium, (**rv1**) materiał zapasowy heterogenny, (**rv2**) materiał zapasowy o małej gęstości elektronowej, (**strzałka**) materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, (**k**) kutikula; TEM, skala = 0,84μm



Fot. 50. Ciało spichrzowe *H. exemplaris* na etapie późnej witelogenezy;

A. na zdjęciu widoczne (**n**) jądro komórkowe, (**nu**) jąderko komórkowe, (*****) wakuola jąderkowa, (**m**) mitochondrium, (**rv1**) materiał zapasowy heterogenny, (**rv2**) materiał zapasowy o średniej gęstości elektronowej, (**strzałka**) materiał zapasowy o dużej gęstości elektronowej, (**k**) kutikula; TEM; skala = 0,74µm



Fot. 51. Ciało spichrzowe

Fot. 51. Materiał zapasowy gromadzony na terenie ciałek spichrzowych *H. exemplaris*;

- A.** Detekcja polisacharydów, na zdjęciu widoczne (**czarna strzałka**) polisacharydy; metoda PAS, mikroskop świetlny; skala = 21,6µm
- B.** Detekcja ciał białkowych, (**czarna strzałka**) ciała białkowe, metoda Bonhag'a mikroskop świetlny; skala = 18µm
- C.** Detekcja lipidów, (**czarna strzałka**) lipidy, Sudan Czarny B, mikroskop świetlny, skala = 12,6µm
- D.** Detekcja kropli lipidowych odczynnikiem BODIPY 483/503 oraz DNA odczynnikiem DAPI; (**czarna strzałka**) (zielone sygnały) krople lipidowe, (niebieskie sygnały) jądra komórkowe, mikroskop konfokalny; skala = 10,8µm

